Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Abteilung für angewandte und klinische Pharmakologie
Abteilungsvorsteher: Professor Dr. med. M. Siess

Kinetik der Oxydation kurzkettiger Fettsäuren im Herzmuskel und ihre wechselseitige Konkurrenz mit dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Bernd-Dieter Ostheim
aus Gettenau

Marburg 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Abteilung für angewandte und klinische Pharmakologie
Abteilungsvorsteher: Professor Dr. med. M. Siess

Kinetik der Oxydation kurzkettiger Fettsäuren im Herzmuskel und ihre wechselseitige Konkurrenz mit dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Bernd-Dieter Ostheim
aus Gettenau

Marburg 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

D i e s e A r b e i t

w u r d e m i t U n t e r s t ü t z u n g d e r

D e u t s c h e n F o r s c h u n g s g e m e i n s c h a f t

d u r c h g e f ü h r t

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am: 25. Juli 1972

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Professor Dr. med. H. Oepen
Referent: Professor Dr. med. M. Siess
Correferent: Professor Dr. med. et Dr. med. dent. H. Heuser

INHALTSVERZEICHNIS:

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodik	3
A. Versuchstiere und Präparation	3
B. Versuchsmaterialien	3
1. Nährlösung	4
2. Herstellung der mit ^{14}C-markierten Substraten versehenen Tyrode-Lösung	4
3. Verwendete Substanzen	5
C. Versuchsanordnung	6
1. Beschreibung und Prinzip der Methode	6
a. Herzvorhöfe mit normalem Glykogengehalt	6
b. Herzvorhöfe nach Glykogenverarmung	6
2. Meßanordnungen	7
a. Meßanordnung zur Registrierung der Kontraktionsarbeit pro Schlag und der Frequenz	7
b. Anordnung zur gleichzeitigen Oxygenierung und Austreibung von $^{14}CO_2$ aus der Nährlösung	7
b_1) Getrennte Muskel- und Oxygenatorkammer mit Pumpe	7
b_2) Einkammer-System	8
b_3) Zweikammer-System ohne Pumpe nach Mensing	8
c. Bestimmung der $^{14}CO_2$-Rate	9
d. Berechnung des O_2-Verbrauches aus der $^{14}CO_2$-Rate exogener Substrate	10
e. Berechnung des Nutzeffektes bei Oxydation von Glucose und Hexanoat	10
f. Zusätzliche Bestimmung des O_2-Verbrauches	11
D, Statistische Methoden	11
III. Versuchsergebnisse	13
A. Kinetik der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Hexanoat	13
1. Abhängigkeit von der Frequenz	13
2. Abhängigkeit der Decarboxylierungsrate von der Substratkonzentration von ^{14}C-Hexanoat	15
3. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von 1,6 mM 14C-Hexanoat durch aufsteigende Konzentrationen von Oktanoat	16

Seite

B. Kinetik der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Oktanoat 17
1. Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat an Herzvorhöfen mit normalem Glykogengehalt und Zusatz exogener Glucose 17
a. Versuche mit 15 mM Glucose und absteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen 17
a_1) Versuche am spontanschlagenden Herzvorhof 17
a_2) Versuche am elektrisch stimulierten Herzvorhof 18
b. Versuche mit Zusatz von 5 mM Glucose 20
b_1) Versuche am spontanschlagenden Herzvorhof mit aufsteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat 20
b_2) Versuche am spontanschlagenden Herzvorhof mit absteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat 20
b_3) Versuche am stillgestellten Herzvorhof mit absteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat 21
2. Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat an glykogenverarmten Herzvorhöfen ohne Glucose 21
a. Versuche an spontanschlagenden Herzvorhöfen mit absteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen 21
b. Versuche an spontanschlagenden Herzvorhöfen mit absteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen und Stimulierung mit Orciprenalin 22
c. Versuche an elektrisch stimulierten Herzvorhöfen mit absteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen und Zugabe von Orciprenalin 23
d. Versuche am stillgestellten Herzvorhof mit absteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen 24
e. Versuche am stillgestellten, glykogenverarmten Herzvorhof mit aufsteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen 25
3. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Oktanoat am stillgestellten Herzvorhof 26
a. Mit aufsteigenden Konzentrationen von Hexanoat 26

Seite

b. Mit aufsteigenden Konzentrationen von Glucose 27
4. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose durch Oktanoat 28
a. Am stillgestellten und am spontanschlagenden Herzvorhof bei Inkubation mit 7,5 mM und 15 mM ^{14}C-Glucose 28
b. Am spontanschlagenden Herzvorhof mit Bestimmung des O_2-Verbrauches 30
C. Kinetik der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Dekanoat 32
1. Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von ^{14}C-Dekanoat an Herzvorhöfen mit normalem Glykogengehalt und Zusatz exogener Glucose 32
a. Versuche mit 15 mM Glucose und absteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Dekanoat am spontanschlagenden Herzvorhof 32
b. Versuche mit 15 mM Glucose und absteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Dekanoat am stillgestellten Herzvorhof 33
c. Versuche mit 5 MM Glucose und aufsteigenen Konzentrationen von ^{14}C-Dekanoat am spontanschlagenden Herzvorhof 33
d. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose durch Dekanoat am spontanschlagenden Herzvorhof 34
e. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose durch Dekanoat am stillgestellten Herzvorhof 34
f. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose durch Dekanoat am stillgestellten Herzvorhof bei gleichzeitiger Messung des O_2-Verbrauches 35
D. Beeinflussung von Leistung, Substratoxydation und Nutzeffekt am spontanschlagenden, elektrisch stimulierten und stillgestellten Herzvorhof durch Hypothermie 36
1. Der spontanschlagende und stillgestellte Herzvorhof 37
2. Der elektrisch stimulierte Herzvorhof 38

Seite

IV. Diskussion 39
V. Zusammenfassung 45
VI. Literaturübersicht 47

I. E I N L E I T U N G :

BING und Mitarbeiter fanden 1954, daß das Herz bevorzugt Fettsäuren verbrennt, während Kohlenhydrate und Milchsäure nur in wesentlich geringerem Prozentsatz verwertet werden. Diese Befunde sind durch die Arbeitskreise von KEUL und Mitarb. (1965) sowie von HOCHREIN und HECK (1967) weiter untersucht und bestätigt worden. Es zeigte sich dabei, daß unter körperlicher Belastung, welche immer mit einem Anstieg der Milchsäure im Serum verbunden ist, diese wiederum mit Fettsäuren konkurrieren kann, und daß die Konkurrenz der Substrate am Gesamt-O_2-Verbrauch des Herzens offensichtlich auch entscheidend von ihrer jeweiligen Konzentration im Serum abhängig ist. Im Serum überwiegen die langkettigen Fettsäuren, während die kurzkettigen nur in geringer Konzentration vorhanden sind. Trotzdem erscheint es von Bedeutung, auch die Kinetik der Fettsäuren in Abhängigkeit von der Zahl der C-Atome zu bestimmen, und sie gewissermaßen als Testmodelle mit der Oxydationskinetik von Glucose und Glucose-Metaboliten zu vergleichen.

Frühere Untersuchungen von PETER (1967), GLOMME (1968), SIESS und GLOMME (1968), SIESS (1969), SCHNEIDER (1970) und SIESS, KELLER et al. (1970) zeigten an isolierten Meerschweinchenherzvorhöfen eine unterschiedliche Aufnahme- und Verdrängungs-Kinetik zwischen Glucose, Lactat und Pyruvat einerseits und den kurzkettigen Fettsäuren Hexanoat und Nonanoat andererseits. Mit einer besonders entwickelten Methode konnte zusammen mit der Herzleistung die Oxydationsrate exogener ^{14}C-markierter Substrate kontinuierlich aus der $^{14}CO_2$-Rate bestimmt werden. Diese Decarboxylierungsrate nimmt mit zunehmender Substratkonzentration in der Nährlösung zu und kann wiederum durch Zusatz inaktiver Substrate gehemmt werden. Auf diese Weise kann die Kinetik der Oxydation und ihre Verdrängungsmechanismen geprüft werden. Die Untersuchungen zeigten, daß die Aufnahmekinetik von Glucose völlig verschieden von der von Pyruvat, Lactat und den kurzkettigen Fettsäuren ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Kinetik der Oxydation der kurzkettigen Fettsäuren (Capronsäure, C_6; Caprylsäure, C_8 und

Caprinsäure, C_{10}) und ihre wechselseitige Konkurrenz mit Sub - straten des Kohlenhydratstoffwechsels im Herzmuskel untersucht werden. Es wurden dabei Versuche am spontanschlagenden, am elek - trisch stimulierten und am stillgestellten Herzvorhof durch - geführt und die Abhängigkeit der Oxydationsrate von der Sub - stratkonzentration und der Leistung untersucht. Dabei fiel auf, daß die Michaelis-Konstanten elektrisch stimulierter Herzvor - höfe immer höher waren als die von spontanschlagenden. Aus diesen Gründen wurden Leistung und Oxydationsrate von Hexanoat und Glu - cose im Temperaturbereich zwischen +37,5° C und ± 0° C am spon - tanschlagenden und am elektrisch stimulierten Herzvorhof geprüft, um das Verhalten des Nutzeffektes und des Stoffwechsels in diesem Temperaturbereich zu vergleichen.

II. M E T H O D I K :

A. Versuchstiere und Präparation:

Für die Versuche wurden insgesamt 108 männliche Meerschweinchen mit Gewichten zwischen 208 und 437 g verwendet. Das mittlere Gewicht der Tiere lag bei 312 g. Die Tiere wurden alle von einem Lieferanten bezogen, kamen jedoch nicht aus einem Reinzuchtstamm. Sie erhielten Trockenfutter der Firma ALTROMIN (Lage/Lippe) und zusätzlich Karotten. Trinkwasser wurde in Saugflaschen gegeben. Die Herzvorhöfe hatten ein Feuchtgewicht (FG) zwischen 55 und 142mg; hier lag der Mittelwert bei 93 mg.

Nach Tötung durch Nackenschlag wurde die Tiere auf ein Präparierbrett aufgespannt und der Herzvorhof nach Eröffnen des Thorax entnommen. Eine ausführliche Beschreibung der Präparation findet sich in der Arbeit von SCHNEIDER (1970). Die Herzvorhöfe wurden in zimmerwarmer Nährlösung mit Glucosezusatz von anhaftenden Geweberesten befreit und danach in eine Plexiglashalterung, wie sie bei SCHNEIDER (1970), RANGE (1970) und KELLER (1970) ausführlich beschrieben ist, an der linken und rechten Herzohrspitze befestigt. Anschließend wurde das fertige Herzvorhofpräparat in der Halterung zur Erholung für mindestens 30 Minuten in eine mit 70 ml Tyrodelösung beschickte Vorbereitungsfritte gebracht, welche mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) durchperlt wurde. Während dieser Erholungszeit wurden durch wiederholtes Spülen Blut- und Serumreste ausgewaschen. Wie durch ITZEL (1969) eingehend untersucht wurde, nimmt der Glykogengehalt in der aerob versorgten 250 µ bis 300 µ breiten Zone (der Aussen- und Innenschicht) des Herzvorhofes wieder zu. Dabei wechselt der Glykogengehalt von Zelle zu Zelle. Nach Untersuchungen von RÖGER (1970) entstehen aber auch in kleineren Herzvorhöfen im Bereich der Scheidewand kleinere anoxische Innenzonen, die glykogenfrei werden.

B. Versuchsmaterialien:

1. Nährlösung:

Wir verwendeten Nährlösung nach TYRODE mit folgender Zusammensetzung:

NaCl	0,8	%	=	137,0 mM
KCl	0,02	%	=	2,6 mM
CaCl	0,02	%	=	1,8 mM
$MgCl_2$	0,01	%	=	1,9 mM
$NaHCO_3$	0,1	%	=	12,0 mM
NaH_2PO_4	0,005	%	=	0,4 mM

alle Substanzen p.a. von der Firma MERCK.

2. Herstellung der mit ^{14}C-markierten Substraten versehenen Tyrodelösung:

Folgende ^{14}C-markierte Substrate wurden verwandt:

a) ^{14}C-Glucose
b) ^{14}C-Na-Hexanoat (C_6-Carbonsäure - Capronsäure)
c) ^{14}C-Na-Oktanoat (C_8-Carbonsäure - Caprylsäure)
d) ^{14}C-Na-Dekanoat (C_{10}-Carbonsäure) - Caprinsäure)

Die ^{14}C-markierten Substrate, die sich in zugeschmolzenen Glasampullen befanden, wurden jeweils mit frisch zubereiteter Tyrodelösung gelöst, welcher vorher nicht-markierte Trägersubstanz in Höhe der gewünschten Konzentration und spezifischen Aktivität zugesetzt worden war. Damit die Fettsäuren als Natrium-Salze vorlagen, wurden die Salze mit äquivalenten Mengen NaOH eingestellt.

a) ^{14}C-Glucose: wurde mit einer Konzentration von 15 mM und einer spezifischen Aktivität von 1 µC/10 µMol in 200 ml Tyrode gelöst.

b) ^{14}C-Na-Hexanoat: wurde mit einer spezifischen Aktivität von 1 µC/7,5 µMol und einer Konzentration von 15 mM in Tyrode gelöst.

c) ^{14}C-Na-Oktanoat: wurde mit einer spezifischen Aktivität von 1 µC/5 µMol und einer Konzentration von 15 mM in Tyrode gelöst.

d) ^{14}C-Na-Dekanoat: wurde mit einer spezifischen Aktivität von 1 µC/2,5 µMol und einer Konzentration von 10 mM in Aqua dest. gelöst.

Die angesetzten Lösungen wurden durch ein Bakterienfilter (Typ 11 D 5) gezogen. Je 4 ml der fettsäure- und 10 ml der glucosehaltigen Tyrode wurden in sterile Glasröhrchen abgefüllt, mit Schliffstopfen verschlossen und bei -20° C eingefroren. Vor Gebrauch wurden die Lösungen bei 30° C aufgetaut, und nach Einbringen in das System zuerst geprüft, ob eine Verunreinigung mit $^{14}CO_2$ vorlag. Während bei Glucose keine Verunreinigung gefunden wurde, zeigte sich bei allen Fettsäuren, besonders deutlich bei Oktanoat, eine radiochemische Verunreinigung, die aber nicht den Fehler von 2 %, welcher im Zertifikat des Herstellers angegeben war, überschritt. Die Verunreinigung fiel rechnerisch nicht ins Gewicht und wurde daher vernachlässigt. Nach etwa 50 Minuten waren die Nährlösungen von gelöstem $^{14}CO_2$ befreit und der Nullpunkt am Elektrometer wieder erreicht.

3. Verwendete Substanzen:

D(+)-Glucose			Fa. Merck
Na-Capronsäure (C_6-Carbonsäure)			Fa. Merck
Caprylsäure (C_8-Carbonsäure)			Fa. Merck
Caprinsäure (C_{10}-Carbonsäure)			Fa. Merck
Orciprenalin (Alupent^R)			Fa. Boehringer, Ingelheim
l-Propranolol (Dociton^R)			Fa. Rhein-Pharma
Kieselgel (Blaugel)			Fa. Riedel de Haen
D-Glucose - ^{14}C (U)			Fa. Radiochemical Centre Amersham/England
CFB 2	Batch 163	3,0 mC/mM	
	Batch 166	2,9 mC/mM	
	Batch 167	2,9 mC/mM	
	Batch 168	3,0 mC/mM	
n-Hexanoic Acid-1-^{14}C sodium salt			Fa. Radiochemical Centre Amersham/England
CFA 118	Batch 9	23,6 mC/mM	

n-Octanoic Acid-1-^{14}C sodium salt			
CFA 93	Batch 10	17,5 mC/mM	Fa. Radiochemical
	Batch 11	19,0 mC/mM	Centre
	Batch 12	19,0 mC/mM	Amersham/England
Decanoic Acid-1-^{14}C			Fa. Radiochemical
CFA 102	Batch 13	16,4 mC/mM	Centre
			Amersham/England

C. Versuchsanordnung:

1. Beschreibung und Prinzip der Methode:

Die Methode ist in früheren Arbeiten (zuletzt bei SCHNEIDER, 1970) ausführlich beschrieben: Isolierte Herzvorhöfe werden in einem rezirkulierenden System mit ^{14}C-markierten Substraten in - kubiert. Das bei der Oxydation entstehende $^{14}CO_2$ wird bei gleich - zeitiger Oxygenierung der Nährlösung mit 95 % O_2 durch 5 % inak - tives CO_2 ausgetrieben und in einer Ionisationskammer (CARY) kon - tinuierlich gemessen. Gleichzeitig wird die Kontraktionsarbeit durch Bewegung einer Feder bei einer bestimmten Vorspannung (500 mg) registriert.

a. Herzvorhöfe mit normalem Glykogengehalt:

In den Untersuchungen von ITZEL (1969) erreichte der Herz - vorhof nach Inkubation in Tyrodelösung mit 15 mM Glucose nach etwa 30 Minuten seinen während der Präparation verloren gegangenen Glykogengehalt wieder, der eine jahreszeitlich differierende Höhe besitzt. Eine weitere Ausdehnung der Erholungszeit bringt keine signifikante Erhöhung des Glykogengehaltes mehr mit sich.

b. Herzvorhöfe nach Glykogenverarmung:

Im Verlaufe der Untersuchungen zeigte sich, daß die Konkur - renz von endogenem Glykogen bei der Bestimmung der Substratkinetik

exogener Fettsäuren stört. Um den Glykogengehalt herabzusetzen, wurde die von ITZEL (1969) angegebene Methode verwandt: Der Herzvorhof wurde 3 Stunden bei Inkubation von 3 mM Glucose mit hohen Dosen ($2 \cdot 10^{-6}$ g/ml) Orciprenalin zu maximaler Leistung stimuliert. In dieser Zeit verliert der Herzvorhof nach ITZEL sein Glykogen fast vollständig, ohne daß dabei glykogenfreie Herzmuskelfasern absterben können, da diese ihre Energie in ausreichendem Maße aus der vorhandenen exogenen Glucose beziehen können. Dabei wird aber der Glykogenabbau nicht gehemmt.

Nach beiden Arten der Vorbereitung wurde dreimal mit glucosefreier Tyrode bei 30° C gespült und dann der Herzvorhof in die Meßanordnung gebracht.

2. Meßanordnungen:

a. Meßanordnung zur Registrierung der Kontraktionsarbeit pro Schlag und der Frequenz:

Die Kontraktionen des spontanschlagenden Herzvorhofs wurden aus der Plexiglashalterung über ein Mikrorollensystem und eine durch ein Öllager abgedichtete Achse aus der geschlossenen Muskelkammer nach außen auf eine Blattfeder übertragen. Die Bewegung der Feder wurde durch aufgeklebte Dehnungsmeßstreifen als Widerstandsänderung über eine Meßbrücke (Philips PR 9302) auf einen Direktschreiber übertragen, wobei gleichzeitig über ein Ratemeter (Philips) die Frequenz auf einem zweiten Kanal registriert werden konnte. Als Schreiber stand ein Zweifach-Direkt-Schreiber "Oscilloscript" (Philips, System Schwarzer) zur Verfügung.

Die Berechnung der Kontraktionsarbeit pro Schlag erfolgte nach der früher angegebenen Formel (SIESS und GLOMME, 1968).

b. Anordnung zur gleichzeitigen Oxygenierung und Austreibung von $^{14}CO_2$ aus der Nährlösung:

b_1) Getrennte Muskel- und Oxygenatorkammer mit Pumpe:

Wie in früheren Arbeiten (PETER, 1967; SIESS und GLOMME, 1968 und SCHNEIDER, 1970) eingehend beschrieben, wurde in einem Teil

der Versuche ein geschlossenes rezirkulierendes System, bestehend aus Muskelkammer, Oxygenatorkammer und Pumpenschlauch, verwandt. Um die Kontraktionen des Herzvorhofs in der Muskelkammer nicht durch Gasblasen zu behindern, war man von dem ursprünglich in einer früheren Dissertation von MÜLLER (1965) benutzten Einkammersystem abgekommen und hatte die Oxygenierung in einer gesonderten kleinen Kammer durchgeführt, in der gleichzeitig das entstehende $^{14}CO_2$ ausgetrieben wurde. Der Nachteil war, daß trotz der Verwendung einer Pumpe die Latenzzeit für die Einstellung eines neuen Gleichgewichtes verlängert wurde.

b_2) Einkammersystem:

Aus diesen Gründen wurde versucht, mit Hilfe der Glasbläser - werkstatt der Institutsgruppe Lahnberge (Herr Glasbläsermeister JUNG), ein Einkammersystem herzustellen, bei dem der Herzvorhof in einer inneren Glaskammer mit der Plexiglashalterung eingesetzt ist. Diese Glaskammer hat besonders geformte Löcher, so daß die in einem äußeren Mantel durchperlenden Gasblasen, die die Lösung oxygenieren, nicht in das Innere der Muskelkammer treten können. Die nicht-gesättigte Lösung diffundierte dagegen ohne Behinderung. Die Gasblasen werden durch eine gesonderte Öffnung abgefangen und der Ionisationskammer zugeführt. Das Prinzip der Kammer ist in der Dissertation von HISCHEBETH (1972) dargestellt. Der Nachteil für unsere Versuche besteht darin, daß aus technischen Gründen das Volumen von 25 ml in dieser Kammer nicht unterschritten werden konnte.

b_3) Zweikammersystem ohne Pumpe nach MENSING: (Abb. 1)

Daher wurde trotz der Brauchbarkeit und rascheren Einstellung nach einer weiteren Lösung gesucht und in einem von H. J. MENSING (1972) entwickelten, verbundenen Zweikammersystem (Abb. 1) eine optimale Lösung zur Messung der Kontraktion und der Decarboxylierungsrate bei rascher Einstellung der Gleichgewichte ohne Pumpensystem gefunden. Das Prinzip dieses Verbundsystems aus beiden Kammern beruht darauf, daß über zwei gleichgerichtete, schräge Glasrohre Muskel- und Oxygenatorkammer miteinander verbunden sind,

Schematische Darstellung des Zweikammer-Systems (ohne Pumpe) nach MENSING

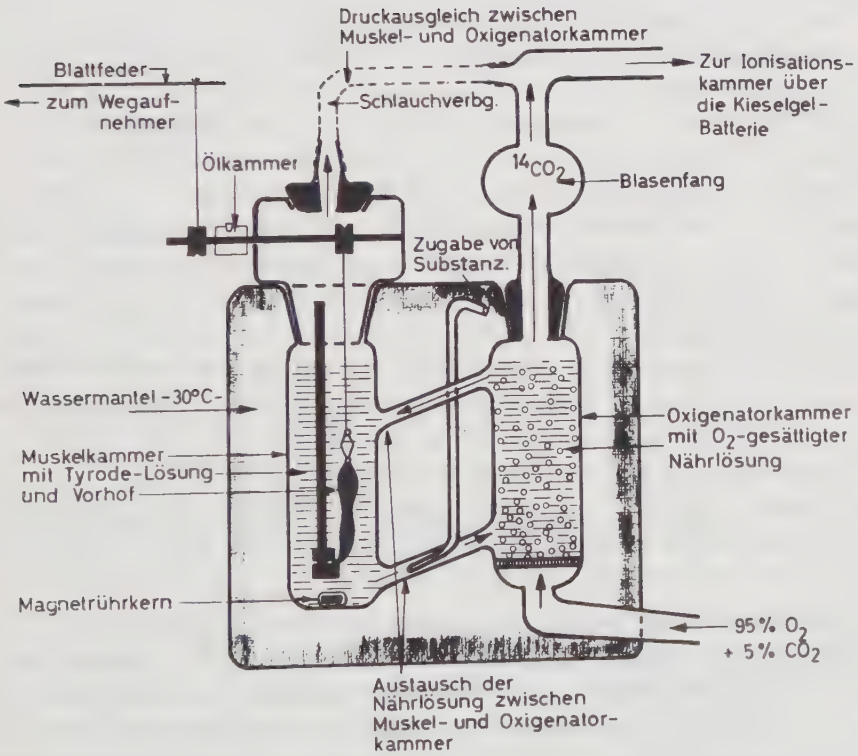


Abb. 1

und durch das Durchperlen des Carbogens ein Kreislauf der oxy - genierten Lösung erzeugt wird, der eine sofortige Aufsättigung der Lösung in der Muskelkammer erlaubt und die Abgabe und den Austausch des dort gebildeten $^{14}CO_2$ mit Rückstrom in die Oxy - genatorkammer bewirkt. Mit diesem Kammersystem wurde der größte Teil der Untersuchungen durchgeführt. Es konnte so das Volumen auf 10 ml Tyrodelösung herabgesetzt werden.

c. Bestimmung der $^{14}CO_2$-Rate:

Das vom Herzvorhof oxydierte ^{14}C-markierte Substrat wird als $^{14}CO_2$ in die Nährlösung abgegeben und durch das in großem Uber - schuß durchperlende inaktive CO_2 des Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) gleichzeitig mit der Oxygenierung der Nährlösung ausgetauscht. Zweifellos wird bei den genannten Versuchsbedingungen entsprechend dem geringen Partialdruck von CO_2 (5 % von 760 Torr) nicht das gesamte $^{14}CO_2$ schlagartig ausgetauscht, sondern es wird ein ge - wisser Zeitraum vergehen, wie sich in der Eliminationskurve des Eichgases sehr deutlich zeigt. Um einen für die genauen Messungen konstanten Gasdurchfluß zu gewährleisten, wurde vor dem Eingang der Oxygenatorkammer und hinter der Ionisationskammer ein Mikro-Flowmeter der Firma KROHNE eingeschaltet, das bei 80 Skalenteilen und einem konstanten Flow von 45 ml pro Minute gehalten wurde. Der Druck wurde über einen feinregulierbaren Druckminderer der Firma DRÄGER (Typ Nr. 14400) zwischen 0,1 und 0,2 kp/cm^2 einge - stellt. Das zweite nachgeschaltete Flowmeter läßt Undichtigkeiten im System durch Absinken des Flow erkennen.

Das wasserdampfgesättigte Gasgemisch mit $^{14}CO_2$ wurde vor Eintritt in die Ionisationskammer entsprechend den Versuchen von SIESS und GLOMME (1968) mit speziell gereinigtem und erhitztem Kieselgel bei 70° C getrocknet und dann der Ionisationskammer (250 ml) zugeleitet, an die eine 90 V-Spannung bei einem Wider - stand von $1{,}2 \cdot 10^{12}$ Ohm angelegt ist. Über einen Vorverstärker wird die durch Zerfall von ^{14}C-Atomen entstehende Spannungsände - rung mit einem Vibrating Reed Elektrometer gemessen und mit einem Kompensationslinienschreiber "Servogor" (Firma METRAWATT) regi - striert. Nach Passieren des zweiten Flowmeter wurde das Gas durch

zwei hintereinander geschaltete Waschflaschen mit konzentrierter Kalilauge geleitet, um das $^{14}CO_2$ abzufangen.

d. Berechnung des O_2-Verbrauches aus der $^{14}CO_2$-Rate exogener Substrate:

Der Sauerstoffverbrauch der verschiedenen Substrate Glucose, Hexanoat, Oktanoat und Dekanoat ergibt sich aus der jeweiligen Summenformel und der für die Oxydation benötigten Menge O_2 durch Multiplizieren der Decarboxylierungsrate (D) in µMol/h·100 mg FG des umgesetzten Substrates mit dem jeweiligen O_2-Faktor:

also	Glucose	D	x 6
	Hexanoat	D	x 8
	Oktanoat	D	x 11
	Dekanoat	D	x 14

Summenformel:

Glucose: $C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$

Hexanoat: $C_6H_{12}O_2 + 8\ O_2 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$

Oktanoat: $C_8H_{16}O_2 + 11\ O_2 \longrightarrow 8\ CO_2 + 8\ H_2O$

Dekanoat: $C_{10}H_{20}O_2 + 14\ O_2 \longrightarrow 10\ CO_2 + 10\ H_2O$

e. Berechnung des Nutzeffektes bei Oxydation von Glucose und Hexanoat:

Für die Versuche bei verschiedenen Temperaturen wurde zusätzlich noch der Nutzeffekt (U) errechnet. Da bei Inkubation mit 2 mM Hexanoat nach den Untersuchungen von KELLER (1970), RANGE (1970) und BISCHOFF (1970) der Anteil der Oxydation von Hexanoat am Gesamt-O_2-Verbrauch 90 - 100 % beträgt und bei der Oxydation dieser Fettsäure aus 1 Mol Hexanoat 45 Mol ATP gewonnen werden, ergibt sich aus dem Hydrolysewert von 1 Mol ATP zu 1 Mol ADP = 7 kcal und dem mechanischen Wärmeäquivalent (1 kcal = 427 mkp) für 1 µMol umgesetztes Hexanoat ein Energiegewinn von 13450 cmp. Für Glucose beträgt er 10760 cmp.

Der Nutzeffekt (U) ist nicht identisch mit dem wahren Nutzeffekt, denn er errechnet sich für Hexanoat aus der Kontraktionsarbeit pro Herzvorhof und ist bezogen auf den ATP-Gewinn aus der Verbrennung exogener Substrate ohne Einbeziehung der Energie aus der Oxydation endogenen Glykogens. Aus der Verbrennung von Hexanoat kann nicht auf den Gesamtkalorienwert geschlossen werden, der noch die Wärmetönung bei Fettsäureverbrennung mit ca 60 % beinhaltet. Damit beträgt der Energiegewinn pro µMol O_2 bei Glucoseverbrennung 1793 cmp und bei Hexanoatverbrennung 1681 cmp (= -6 % !).

f. Zusätzliche Bestimmung des Sauerstoffverbrauches:

In einigen Versuchen wurde außer der Decarboxylierungsrate und der Herzleistung gleichzeitig auch der Sauerstoffverbrauch bestimmt. Hierfür diente die von SIESS, KELLER et al. (1970) beschriebene Apparatur. Auf diese Weise war es möglich, Verschiebungen des oxydierten Substratanteils am O_2-Verbrauch durch Zugabe konkurrierender Substrate zu prüfen, sowie entkoppelnde Effekte durch Anstieg des Sauerstoffverbrauchs am stillgestellten Herzvorhof zu beobachten.

D. Statistische Methoden: (nach Documenta GEIGY-Wissenschaftl. Tab.)

1. Mittelwert:

Für die Bestimmung des Mittelwertes wurde folgende Formel benutzt:

$$\text{Mittelwert } \bar{x} = \frac{S(x)}{N}$$

S(x) = Summe der Einzelwerte
N = Anzahl der Einzelwerte

2. Die Standardabweichung des Mittelwertes (σ_m) errechnet sich aus:

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{S(x^2) - \bar{x} \cdot S(x)}{N \cdot (N - 1)}}$$

$S(x^2)$ = Summe der Einzelwert-Quadrate

3. Berechnung der Regressionsgeraden:

Bei der Aufzeichnung der Kinetik nach LINEWEAVER-BURK ergibt sich eine Gerade. Diese Gerade ($y = a + b \cdot x$) läßt sich mit Hilfe der x- und y-Koordinaten der Meßpunkte errechnen:

$$\text{Steigung } b = \frac{S_{xy} \cdot N - S_x \cdot S_y}{S(x^2) \cdot N - (S_x)^2}$$

S_{xy} = Summe aus den Einzelprodukten ($x_i \cdot y_i$) der x- und y-Koordinaten der Meßpunkte
S_x = Summe der x-Koordinaten
S_y = Summe der y-Koordinaten
$S(x^2)$ = Summe der Quadrate der x-Koordinaten

Schnittpunkt O|a der Geraden mit der Ordinate:

$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$
$\bar{y}$ = Mittel der y-Koordinaten S_y/n
$\bar{x}$ = Mittel der x-Koordinaten S_x/n
n = Zahl der Meßpunkte

Berechnung von V_{max} und K_m aus der Formel der Regressionsgeraden:

$$V_{max} = \frac{1}{a}$$

Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate = $\frac{1}{V_{max}}$

$$K_m = \frac{b}{a}$$

Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse
= negative reziproke Michaelis-Konstante

III. V E R S U C H S E R G E B N I S S E :

A. Kinetik der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Hexanoat:

1. Abhängigkeit von der Frequenz: (Abb. 2)

In früheren Untersuchungen war festgestellt worden, daß mit aufsteigender Hexanoat-Konzentration die Decarboxylierung entsprechend einer Michaelis-Menten-Kinetik ansteigt, und daß für Hexanoat bei Abwesenheit von Glucose eine Michaelis-Konstante bei einem K_m von 0,46 mM und einem V_{max} von 1,10 µMol/h·100 mg FG am spontanschlagenden Herzvorhof resultiert. Am stillgestellten Herzvorhof ergab sich kein signifikanter Unterschied der Michaelis-Konstante, während V_{max} etwa 50 % des mit einer Frequenz von 110 bis 120/min schlagenden Herzvorhofes betrug.

Um den Einfluß der Frequenz auf die Decarboxylierung festzustellen, wurde bei Inkubation mit 1,6 mM ^{14}C-Hexanoat die Decarboxylierungsrate bei elektrischer Stimulierung geprüft. Aus früheren Versuchen war bekannt, daß bei Inkubation mit 2 mM Hexanoat dessen Oxydationsanteil am Gesamt-O_2-Verbrauch etwa 80 % bis 90 % beträgt. Bei Inkubation mit 1,6 mM Hexanoat liegt die Oxydationsrate etwa 20 % tiefer, der Kohlenhydratanteil am Gesamt-Sauerstoffverbrauch daher entsprechend höher.

Die Reizbildungszentren am Sinusknoten wurden durch Ausschneiden und Quetschen ausgeschaltet. Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, folgt die Decarboxylierungsrate mit aufsteigender Frequenz einer Geraden, die bei Frequenz Null, welche nach Ausschalten des Reizgebers geprüft wurde, einen Ruhestoffwechsel von 0,15 µMol/h·100 mg FG ergibt.

Die Gleichung der in Abbildung 2 dargestellten Geraden wurde wie folgt abgeleitet:

Die Geradengleichung

$$(1) \qquad y = a + bx$$

ergibt übertragen:

Decarboxylierungsrate von 1.6 mM ^{14}C-Hexanoat (spez. Akt. 1 µC/7.5 µMol) + 5 mM Glucose am elektrisch stimulierten Herzvorhof (1.0 ms/2.0 mA) in Abhängigkeit von der Frequenz

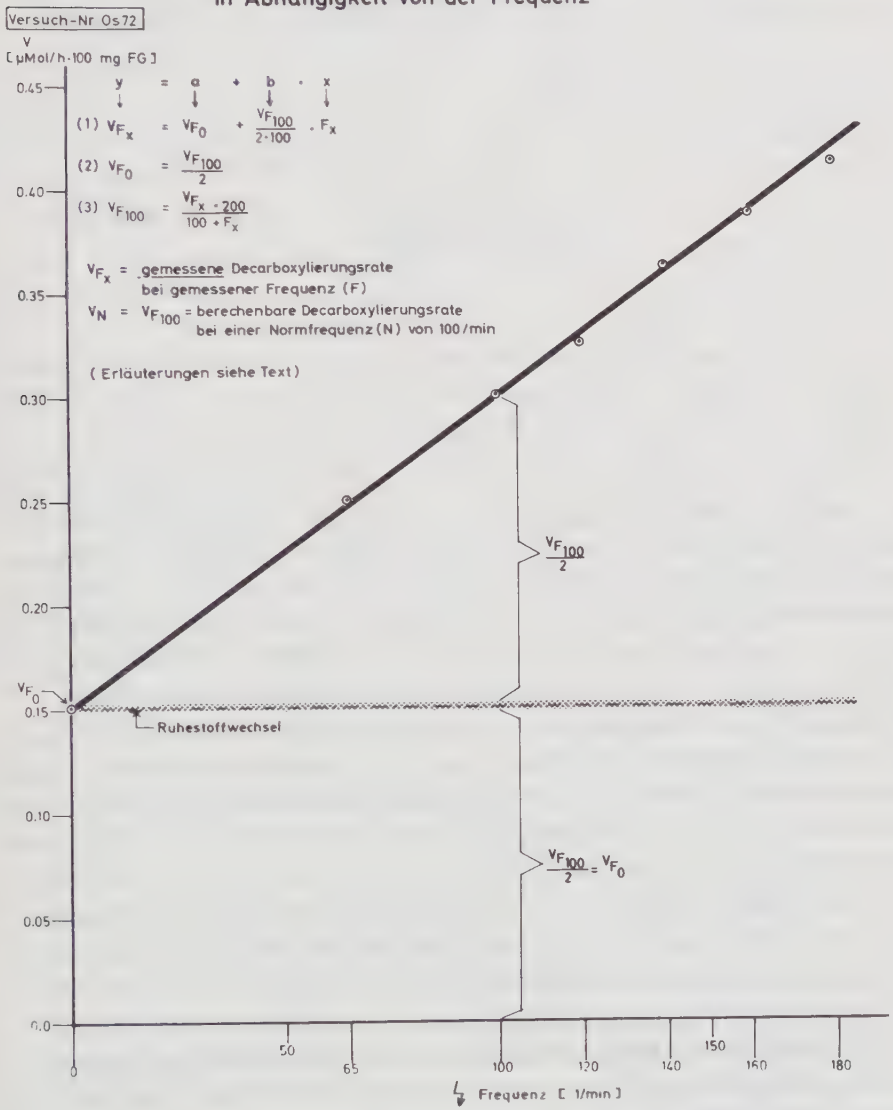


Abb. 2

$$(2) \qquad V_{F_x} = V_{F_0} + \frac{V_{F_{100}} - V_{F_0}}{2 \cdot 100} \cdot F_x$$

da nach Messung

$$(3) \qquad V_{F_0} = \frac{V_{F_{100}}}{2}$$

gilt: (3) in (2)

$$(4) \qquad V_{F_x} = \frac{V_{F_{100}}}{2} + \frac{V_{F_{100}} \cdot F_x}{2 \cdot 100}$$

aufgelöst nach $V_{F_{100}}$

$$(5) \qquad V_{F_{100}} = \frac{V_{F_x} \cdot 200}{100 + F_x}$$

Gemäß der hergeleiteten Formel ist es auf diese Weise möglich, von jeder Decarboxylierungsrate, die bei einer bestimmten Frequenz gemessen wurde, auf einen Standardwert einer angenommenen Frequenz 100/min umzurechnen. Dies erschien deshalb von Vorteil, da bei spontanschlagenden Herzvorhöfen unterschiedliche Ausgangsfrequen - zen und Änderungen der Spontanfrequenz, verursacht durch verschie - dene Konzentrationen der Fettsäure, einen Vergleich erschweren, beziehungsweise unmöglich machen. In einem großen Teil der Ver - suche wurde daher auf Normwerte von F = 100/min umgerechnet. Änderungen der Kontraktionskraft zeigten sich wesentlich schwächer in ihrer Auswirkung auf den oxydativen Stoffwechsel als Frequenz - änderungen.

Die Beobachtung, daß bei der durchschnittlichen Spontanfre - quenz der Herzvorhöfe von 100/min der Ruhestoffwechsel etwa 50 % beträgt, wurde schon von KELLER (1970), SCHNEIDER (1970), RANGE (1970) und anderen gemacht. Bei höherer Frequenz betrug der Ruhe - stoffwechsel entsprechend weniger (40 %). Die Formel bestätigte sich in den folgenden Versuchen bei Stimulierung mit F_{100} und F_{150}, wobei die Werte von F_{100} einmal gemessen und einmal aus F_{150} um - gerechnet wurden. Es ergab sich in der Mehrzahl der Fälle eine sehr gute Übereinstimmung.

2. Abhängigkeit der Decarboxylierungsrate von der Substratkonzentration von ^{14}C-Hexanoat: (Abb. 3 und 4)

In zwei Versuchen (Os 69 und 70, Abb. 3 und 4) wurden die Reizbildungszentren durch Ausschneiden und Quetschen ausgeschaltet. Bei einer Frequenz von 100/min und 150/min wurde die Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Hexanoat mit absteigenden Konzentrationen bei Anwesenheit von 15 mM Glucose geprüft.

Wie Abbildung 3 zeigt, nimmt die Decarboxylierungsrate mit der Konzentration ab, wobei der steilste Teil zwischen 0,4 und 0,05 mM fällt und erwartungsgemäß mit erhöhter Frequenz (150/min) immer höhere Werte als bei Frequenz 100/min gefunden wurden. Rechnet man von F_{150} mit der oben angegebenen Formel auf F_{100} um, so ergibt sich ein fast völliges Übereinstimmen der gemessenen mit den berechneten Werten; ein Zeichen für die Allgemeingültigkeit der Gleichung.

Auch Abbildung 4 zeigt einen praktisch identischen Verlauf; nur liegen hier die berechneten Werte bei der Konzentration 0,8 mM etwas von den gemessenen F_{100}-Werten entfernt. Alle übrigen Werte fallen praktisch zusammen.

Bestimmt man nun die Michaelis-Menten-Kinetik nach Lineweaver-Burk (Abb. 3 und 4, unten), so zeigt sich nur im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 und 1,6 mM eine bei beiden Versuchen sehr ähnliche Michaelis-Konstante von 0,58 mM bei F_{150} und 0,52 mM bei F_{100}, während erwartungsgemäß V_{max} bei F_{150} mit 0,94 µMol/h und 100 mg FG beträchtlich höher liegt, als das bei F_{100} gemessene mit 0,69 µMol/h·100 mg FG. Die berechneten Daten für V_{F100} zeigen die gleiche Michaelis-Konstante wie bei F_{150}, bei einem geringfügig höheren V_{max} (0,74 µMol/h·100 mg FG).

In Abbildung 4 zeigen sich ähnliche Ergebnisse: Bei F_{150} erhält man eine Michaelis-Konstante von 0,60 mM mit einem V_{max} von 0,96 µMol/h·100 mg FG, aus dem sich ein V_{F100} berechnen läßt mit derselben Michaelis - Konstante, was mathematisch zu erwarten ist, und einem V_{max}, das mit 0,76 µMol/h·100 mg FG dem des Versuchs Os 69 entspricht. Die gemessenen werte von V_{F100} liegen in diesem Versuch allerdings etwas höher. Dies ist bedingt durch eine Abweichung bei den Konzentrationen 0,2 und 0,8 mM. Daraus ergibt sich in diesem Fall eine Michaelis-Konstante

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Hexanoat (spez. Akt. 1 µC/7.5 µMol) + 15 mM Glucose am elektrisch stimulierten Herzvorhof (1.0 ms/2.0 mA) in Abhängigkeit von Außenkonzentration (S) und Frequenz

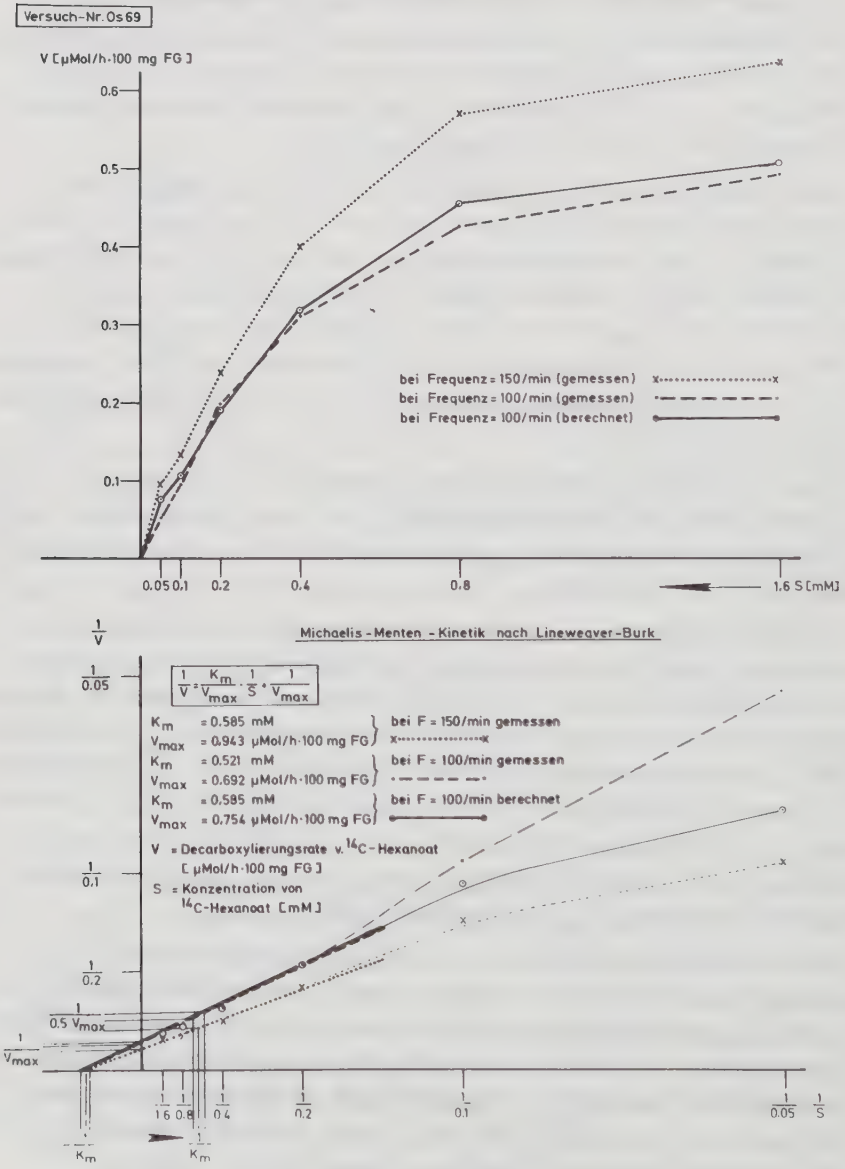


Abb. 3

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Hexanoat (spez. Akt. 1 µC/7.5 µMol) + 15 mM Glucose am elektrisch stimulierten Herzvorhof (1.0 ms/2.0 mA) in Abhängigkeit von Außenkonzentration (S) und Frequenz

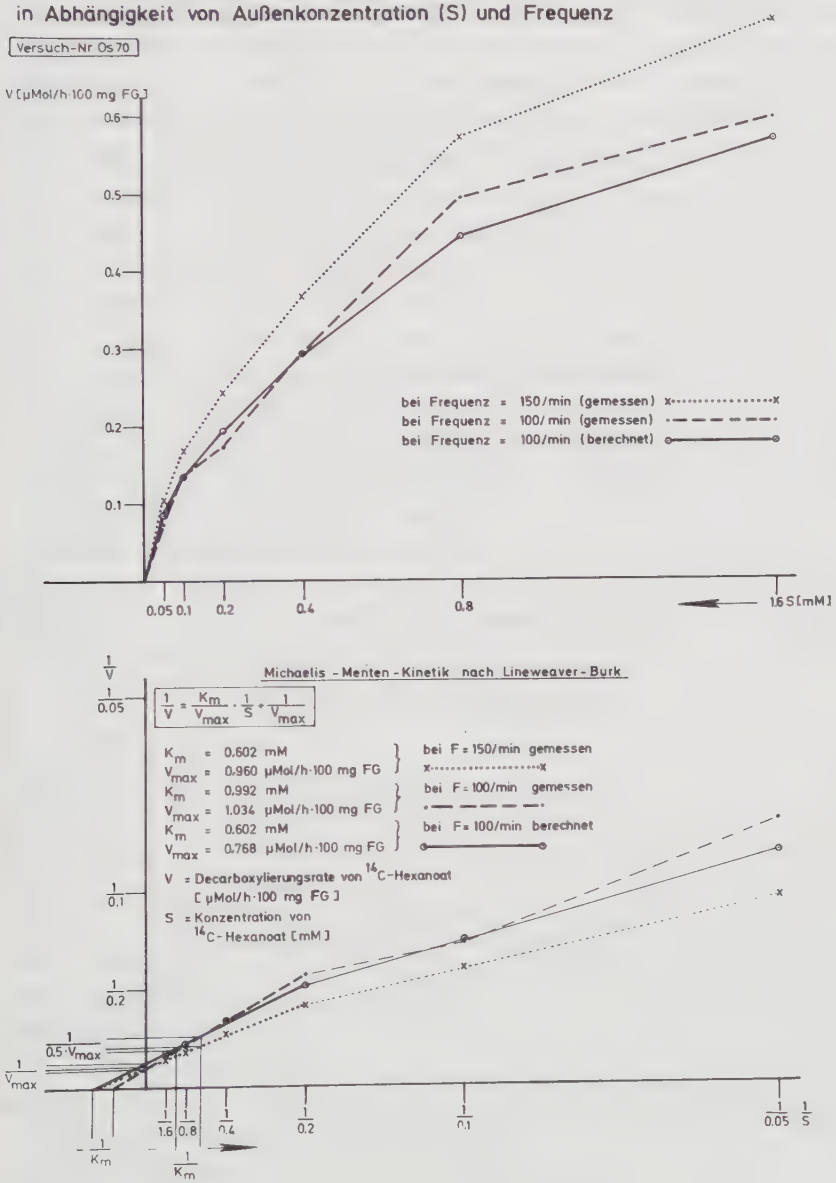


Abb. 4

von 0,99 mM und ein V_{max} = 1,00 µMol/h·100 mg FG. Bei den Konzentrationen mit 0,05 mM und auch bei einem Teil mit 0,1 mM Hexanoat folgt die Umsatzrate nicht mehr der Kinetik. Die Werte weichen dabei nicht einheitlich von der Geraden ab, so daß die höhere Streubreite der Meßgenauigkeit bei diesen sehr niedrigen Umsatzraten vermutlich dafür verantwortlich zu machen sein dürfte.

Es ergibt sich demnach bei beiden Versuchen mit elektrischer Stimulierung aus der Michaelis-Menten-Kinetik für ^{14}C-Hexanoat ein etwas höheres K_m und niedrigeres V_{max} als einst von PETER (1967) und SCHNEIDER (1970) am spontanschlagenden Herzvorhof mit einem K_m von 0,41 mM und einem V_{max} von 1,1 µMol/h·100 mg FG und bei einer Frequenz von etwa 130/min gemessen wurden. Da V_{max} offensichtlich von der Frequenz abhängig ist, wäre dies durchaus verständlich. Die Decarboxylierungsrate liegt bei einer Frequenz von 100/min bei 1,6 mM Hexanoat in beiden Versuchen mit 0,57 und 0,52 µMol/h·100 mg FG sehr eng beieinander. Der daraus resultierende Sauerstoffverbrauch beträgt 4,56 bzw. 4,16 µMol/h·100 mg FG und liegt damit niedriger als der gemessene Gesamt-O_2-Verbrauch von 6,59 µMol/h·100 mg FG (SIESS, KELLER et al. 1970), so daß mit einem beträchtlichen oxydierten Kohlenhydratanteil (35 - 40 %) bei dieser von 2 mM auf 1,6 mM gesenkten Hexanoat-Konzentration zu rechnen ist.

3. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von 1,6 mM ^{14}C-Hexanoat durch aufsteigende Konzentrationen von Oktanoat: (Abb. 5)

In einem Versuch wurde am stillgestellten Herzvorhof bei einer Konzentration von 1,6 mM ^{14}C-Hexanoat mit 5 mM Glucose - zusatz aufsteigende Konzentrationen von Oktanoat gegeben. Dabei zeigte sich interessanterweise, daß bereits ab 1 mM Oktanoat bis zur Endkonzentration von 4 mM Oktanoat die Decarboxylierungsrate von Hexanoat noch steigt. Da bei einer Konzentration von 1,6 mM ^{14}C-Hexanoat noch ein beträchtlicher Anteil (60 %) aus dem Kohlenhydratstoffwechsel am Gesamt-O_2-Verbrauch zu erwarten ist, könnte durch Oktanoat ein weiteres Zurückdrängen des aus der Glykolyse stammenden Anteils am Stoffwechsel erfolgen und das schneller als Oktanoat in den Stoffwechsel eingehende Hexanoat dadurch bevorzugt verbrannt werden. Für eine Hemmung der Glykogenolyse durch Oktanoat

Beeinflussung der Decarboxylierungsrate (V) von 1.6 mM ^{14}C-Hexanoat (spez. Akt. 1 µC/7.5 µMol) am stillgestellten Herzvorhof mit aufsteigenden Konzentrationen von Oktanoat (S)

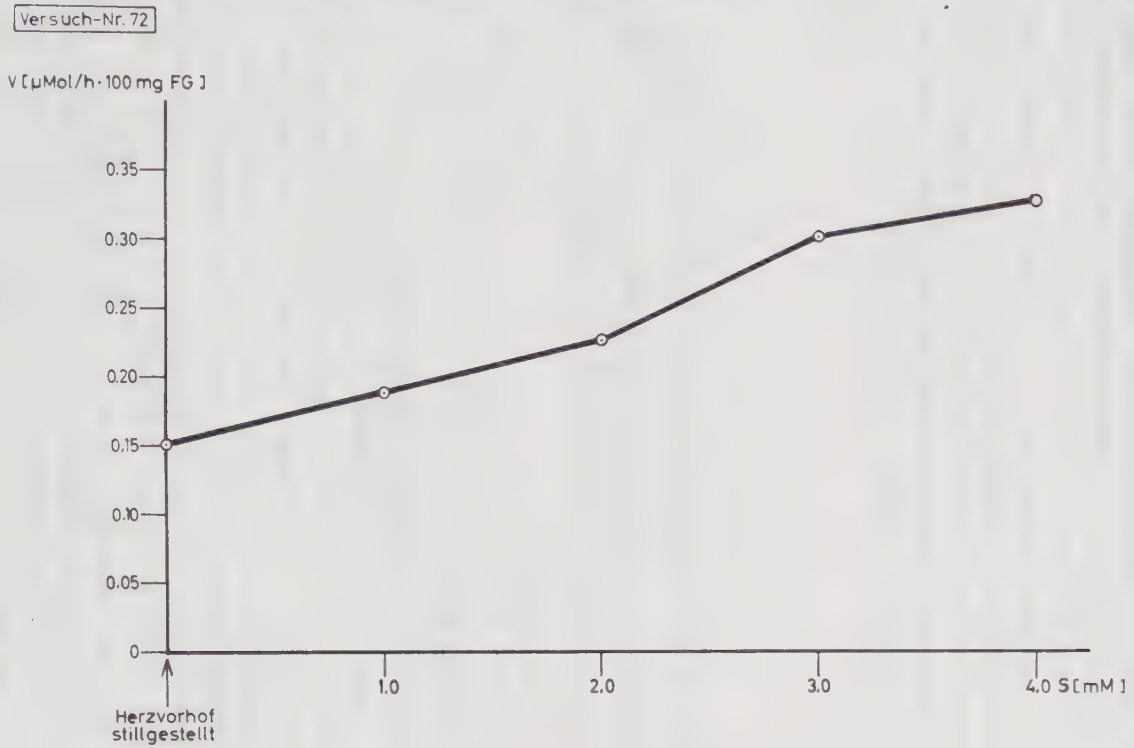


Abb. 5

am stillgestellten Herzvorhof sprechen auch spätere Versuche, bei denen sich V_{max} am schlagenden und stillgestellten Herzvorhof nur geringfügig unterschied. Die Zunahme der Decarboxylierungsrate von 0,15 auf 0,3 µMol/h·100 mg FG entspricht einer Verschiebung zur Fettsäureverbrennung um ca 50 %. Als Alternative müßte aber auch bei den hohen Konzentrationen beider Fettsäuren an einen additiven membranschädigenden Effekt mit eventueller Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung gedacht werden, wobei ein Anstieg des Sauerstoffverbrauches zu erwarten wäre.

B. Kinetik der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Oktanoat:

1. Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat an Herzvorhöfen mit normalem Glykogengehalt und Zusatz exogener Glucose:

a. Versuche mit 15 mM Glucose und absteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen:

a_1) Versuche am spontanschlagenden Herzvorhof: (Abb. 6)

Inkubiert man Herzvorhöfe mit 1,6 mM ^{14}C-Oktanoat + 15 mM Glucose, so stellt sich ein Decarboxylierungsgleichgewicht nach etwa 90 Minuten ein. Verdünnt man nun fortlaufend von 1,6 mM über 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 bis 0,05 mM ^{14}C-Oktanoat unter gleich - bleibendem Glucoseanteil, so zeigt sich eine Abnahme der Decarb - oxylierungsrate, die ähnlich wie bei Hexanoat besonders steil zwischen 0,4 und 0,05 mM verläuft.

Wie aus Abbildung 6, oben, hervorgeht, nimmt die Frequenz bei allen drei Versuchen mit Abnahme der Konzentration von Oktanoat zu. Da gleichzeitig auch eine beträchtliche Schwankung in der Höhe der Ausgangsfrequenz bestand, erschien es erlaubt, die für Hexanoat gefundene Formel auch für diese Versuche an - zuwenden. Die auf diese Weise korrigierten Werte ergeben eine Michaelis - Menten - Kinetik mit einem einheitlichen K_m zwischen 0,17 mM und 0,20 mM. Das V_{max} dagegen schwankte zwischen

Decarboxylierungsrate (V) und Frequenz von ^{14}C-Oktanoat (spez.Akt. 1 µC/5 µMol) +15 mM Glucose am spontanschlagenden Herzvorhof in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S)

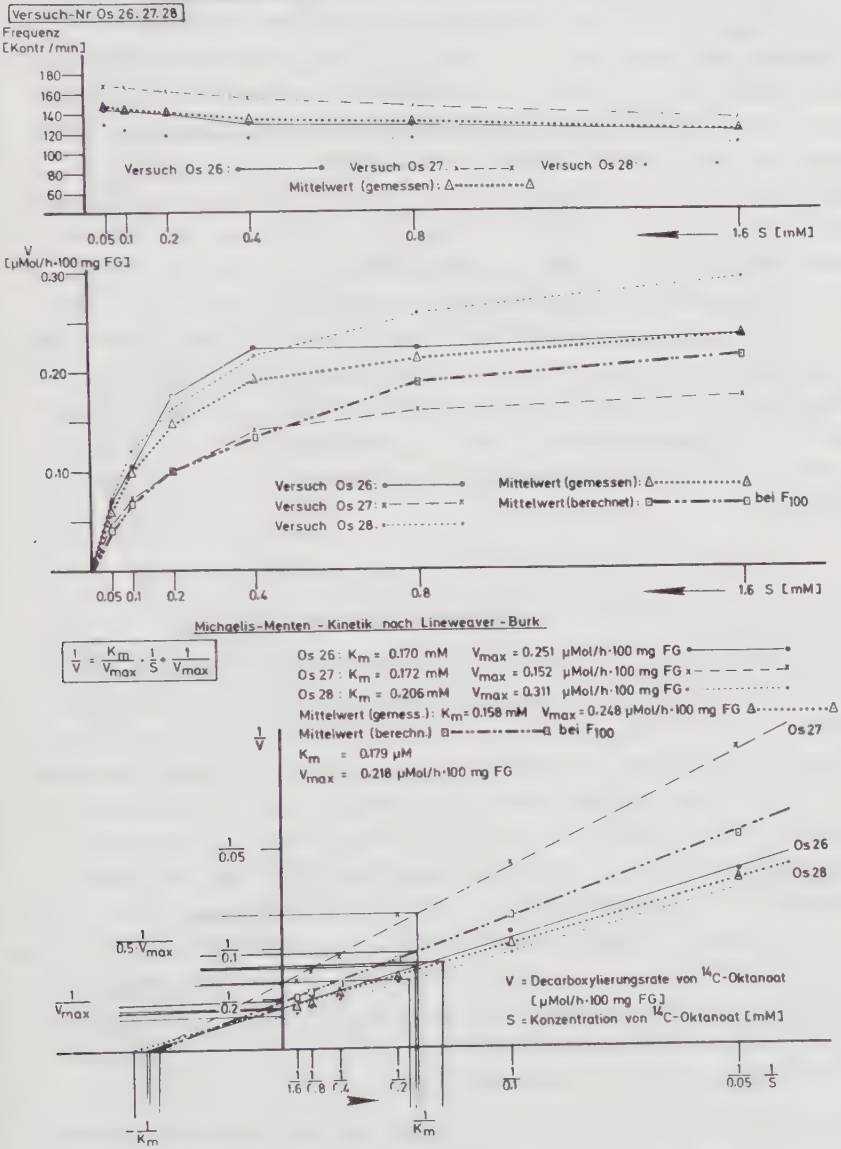


Abb. 6

0,15 und 0,31 µMol/h.100 mg FG. Vergleicht man die mittlere Arbeit pro Schlag (E_s) der einzelnen Versuche, so fällt auf, daß Versuch Os 28 mit der größten mittleren Arbeit E_s = 200 mm•mp auch das höchste V_{max} = 0,31 µMol/h•100 mg FG besitzt, während die beiden anderen Versuche mit 0,15 und 0,25 µMol/h•100 mg FG beträchtlich niedrigere Umsatzraten besitzen. Rechnet man für die V_{max}-Werte den jeweiligen Sauerstoffverbrauch aus, finden sich Werte zwischen 1,65 und 3,41 µMol/h•100 mg FG. Diese niedrigen O_2-Werte bedeuten, daß offensichtlich ein beträchtlicher Glucoseanteil mit verbrannt wird. Noch deutlicher wird dies bei der vergleichbaren Konzentration von 1,6 mM Oktanoat, wobei bei einer mittleren Frequenz von 100/min ein Oktanoatumsatz von 0,22 µMol pro h und 100 mg FG resultiert. Der zugehörige Sauerstoffverbrauch beträgt 2,4 µMol/h•100 mg FG. Bei einem gemessenen mittleren O_2-Verbrauch von 6,5 µMol/h•100 mg FG (SIESS, KELLER et al. 1970) würde damit der Oktanoatanteil nur 37 % betragen. Es muß also Glucose bevorzugt verbrannt werden. Bei Hexanoat (1,6 mM) waren es 55 - 60 %.

a_2) Versuche am elektrisch stimulierten Herzvorhof: (Abb. 7 u. 8)

Um festzustellen, inwieweit Unterschiede bei elektrischer Reizung gegenüber spontanschlagenden Herzvorhöfen zu beobachten sind, wurde in zwei Versuchen das Decarboxylierungsgleichgewicht bei Frequenz 150/min und im gleichen Versuch bei 100/min bestimmt. Dazu wurde, wie beschrieben, das Reizbildungszentrum zerstört. Die Nährlösung enthielt 15 mM inaktive Glucose und ^{14}C-Oktanoat in Konzentrationen von 1,6 mM absteigend bis 0,05 mM. Die Kontraktionsarbeit in beiden Versuchen war gleichbleibend gut. Versuch Os 62 (Abb. 7) zeigt sehr deutlich eine Abnahme entsprechend der jeweiligen Frequenz. Die von 150/min aus berechneten V_{F100}-Werte stimmen praktisch genau mit den gemessenen V_{F100}-Werten im Bereich von 0,2 bis 1,6 mM überein, so daß auch für Oktanoat die für Hexanoat gültige Formel zutrifft.

Die Auftragung nach Lineweaver-Burk ergibt aber nur im Bereich von 0,2 bis 1,6 mM für V_{F100} und V_{F150} lineare Beziehungen, wobei der Schnittpunkt der Regressionsgeraden eine einheitliche sehr hohe Michaelis-Konstante ergibt. Auch hier ist das V_{max} bei F_{150}

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) +15 mM Glucose am elektrisch stimulierten Herzvorhof (1.0 ms/2.0 mA) in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S) und Frequenz

Versuch-Nr. Os 62

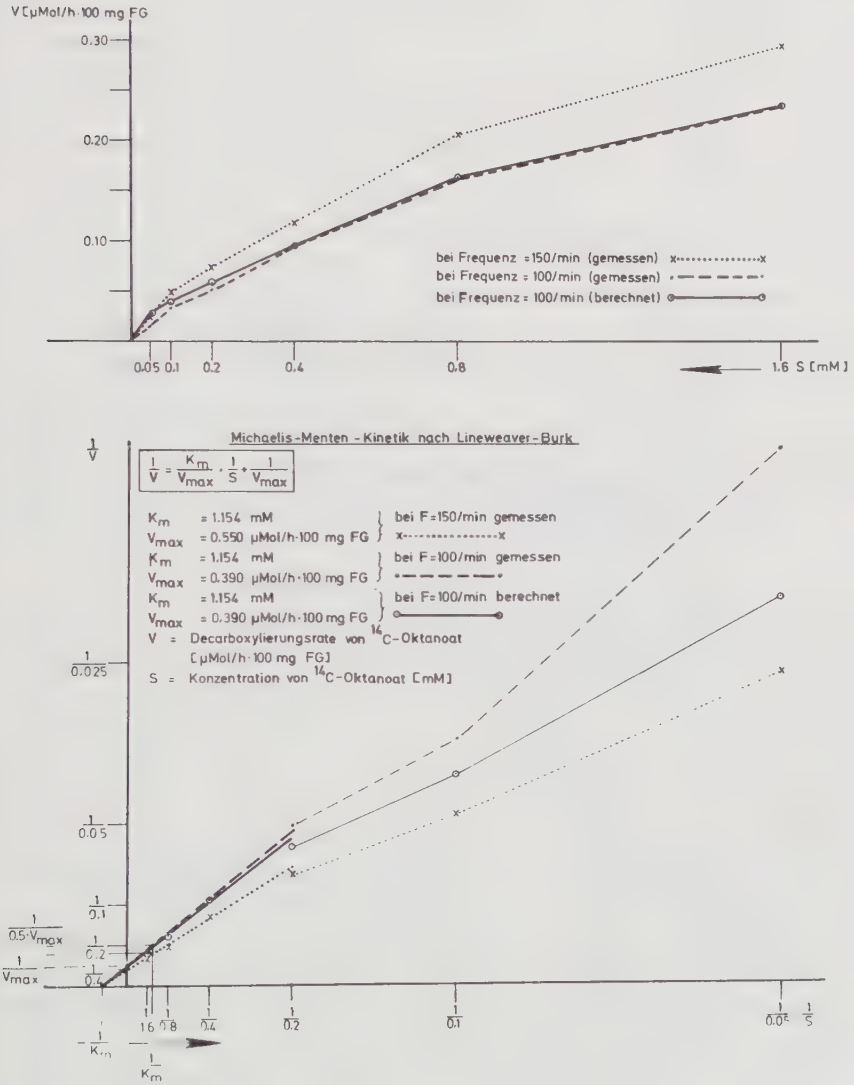


Abb. 7

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) +15 mM Glucose am elektrisch stimulierten Herzvorhof (1.0 ms/2.0 mA) in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S) und Frequenz

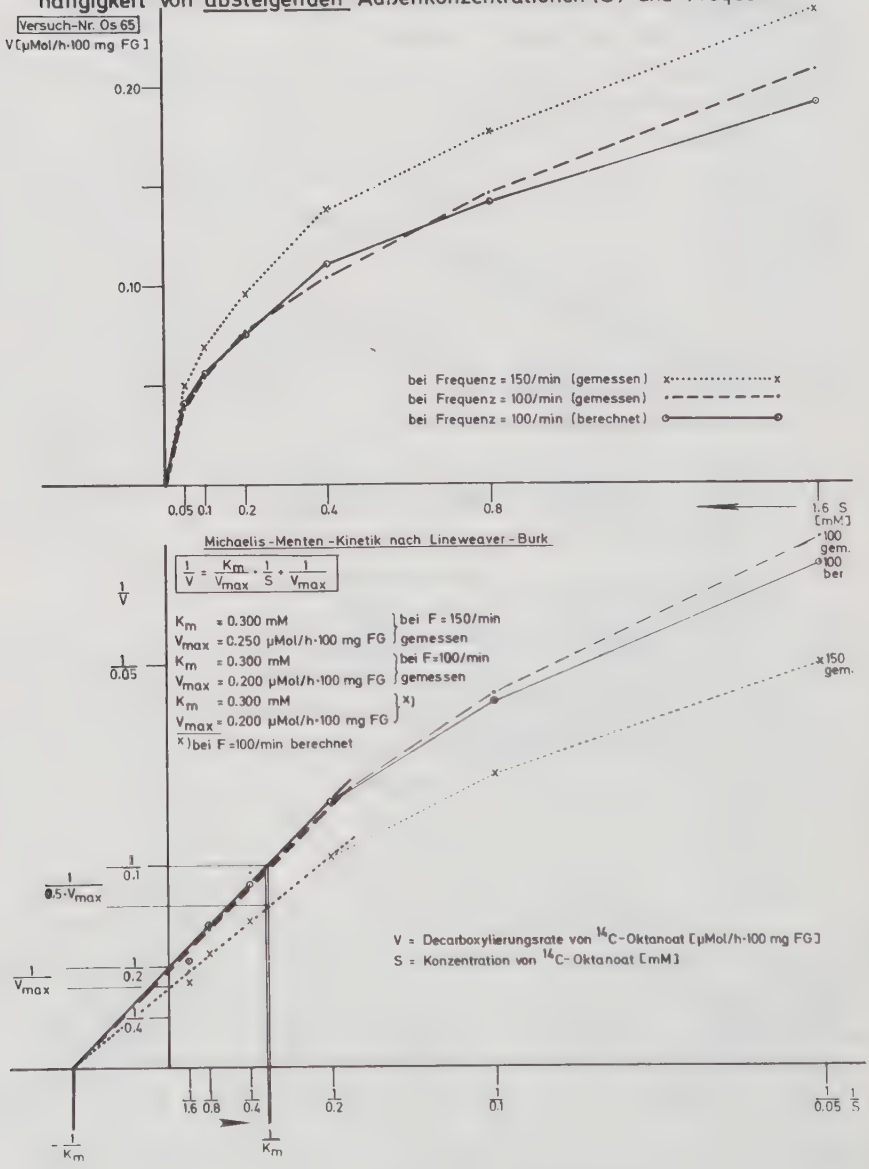


Abb. 8

höher als bei 100/min; die gemessenen und die berechneten V_{F100}-Werte stimmen genau überein. Bei den niedrigen Konzentrationen von 0,05 und 0,1 mM zeigen sich auch hier Abweichungen, wie sie am spontanschlagenden Herzvorhof eigenartigerweise nicht beobachtet wurden. Vor allem bei F_{150} liegen die reziproken Umsatzwerte auf die Gerade bezogen zu tief, so daß hier bei elektrischer Reizung möglicherweise die Fettsäuren vor den Kohlenhydrat-Metaboliten verbrannt werden. Es muß aber bei den niedrigen Meßwerten immer die relative Meßgenauigkeit in Betracht gezogen werden.

Versuch Os 65 (Abb. 8) wurde in gleicher Weise durchgeführt. Auch hier zeigte sich ganz analog zu Versuch Os 62 (Abb. 7) ein fast völliges Übereinstimmen der V_{F100}-Werte (berechnet und gemessen). Lineare Beziehungen nach Lineweaver-Burk bestanden auch hier nur zwischen 0,2 mM und 1,6 mM, während bei niedrigeren Konzentrationen (0,1 und 0,05 mM) die Umsatzrate relativ zu hoch erschien. Die Michaelis-Konstante ist nun eigenartigerweise trotz gleicher Reizstärke wesentlich niedriger als in Versuch Os 62 (Abb. 7), liegt aber immer noch höher als beim spontanschlagenden Herzvorhof: Bei beiden Frequenzen ein K_m von 0,3 mM; V_{max} liegt mit F_{150} bei 0,25 und mit F_{100} bei 0,20 µmol/h·100 mg FG.

Gegenüber dem Versuch in Abbildung 7 besteht ein besonders deutlicher Unterschied zwischen dem dort beobachteten K_m von 1,15mM einerseits, wie auch dem wesentlich höheren V_{max} von 0,39 µMol/h und 100 mg FG andererseits. Übereinstimmend in beiden Versuchen ist die Michaelis-Konstante gegenüber den spontanschlagenden Herzvorhöfen erhöht; während das V_{max} in Versuch Os 65 (Abb. 8) praktisch gleich geblieben ist, erscheint es in Versuch Os 62 (Abb.7) erhöht. Erklärt werden könnte dies eventuell dadurch, daß es bei elektrischer Stimulierung zusätzlich zur konzentrationsbedingten Konkurrenz der Substrate zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Glucose- und Fettsäure-Anteil kommt. In Versuch Os 62 (Abb. 7) müßte der Glucoseverbrauch bei einem V_{max} von 0,39 µMol/h und 100 mg FG durch elektrische Reizung zurückgedrängt sein, wobei aber eine Erhöhung der Michaelis-Konstante eine erschwerte Diffusion von Oktanoat durch die Zellmembran oder einen erschwerten Eintritt in den Stoffwechsel andeuten würde.

Bei Versuch Os 65 (Abb. 8) ist mit einem V_{max}, ähnlich wie bei spontanschlagenden Herzvorhöfen noch keine Verschiebung, sondern

nur eine Erhöhung der Michaelis-Konstante zu beobachten. Da bei niedrigen Konzentrationen bei elektrischer Reizung eine relativ zu hohe Oxydationsrate der Fettsäure beobachtet wird, und diese Werte fast stets am Ende des Versuchs bestimmt wurden, könnte also eine Bevorzugung der Fettsäureverbrennung unter elektrischer Stimulierung auch in Abhängigkeit von der Zeit erfolgen.

b. Versuche mit Zusatz von 5 mM Glucose:

b_1) Versuche am spontanschlagenden Herzvorhof mit aufsteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat: (Abb. 9)

Ein Einzelversuch mit aufsteigenden Konzentrationen und 5 mM Glucose (Abb. 9) zeigte eine sehr schöne Übereinstimmung der gemessenen Werte (K_m = 0,14 mM, V_{max} = 0,22 µMol/h·100 mg FG) mit den auf F_{100} umgerechneten Werten: K_m = 0,18 mM und V_{max} = 0,21µMol pro h und 100 mg FG, die praktisch mit den vorher gewonnenen Werten identisch sind. Interessant ist, daß hier auch die niedrigen Konzentrationen von 0,05 mM und 0,1 mM mit auf der Geraden liegen, während in allen Versuchen mit absteigender Reihenfolge die Werte von 0,05 und 0,1 mM außerhalb der Regressionsgeraden liegen. Die unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen von 5 mM und 15 mM haben in den vorhergehenden Versuchen offensichtlich keinen Einfluß auf die Michaelis-Konstante. Möglicherweise kommt es durch eine Wechselwirkung zwischen der exogenen Glucose-Konzentration und dem endogenen Glykogen zu einem konstanten Flux aus der Glykolysekette in den Oxydationszyklus.

b_2) Versuche am spontanschlagenden Herzvorhof mit absteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat: (Abb. 10)

Bei absteigenden Konzentrationen und Inkubation mit 5 mM Glucose ergibt sich in drei Versuchen eine gute Übereinstimmung zwischen gemessenen und berechneten Mittelwerten, welche besagt, daß in diesen Versuchen die Frequenz nicht wesentlich um den Wert F = 100/min schwankte. Bei ähnlichem V_{max} zeigt sich eine Michaelis-Konstante von 0,24 mM berechnet und 0,25 mM gemessen. Gegenüber dem unter gleichen Versuchsbedingungen mit aufsteigenden Konzentrationen durchgeführten Versuch Os 15 (Abb. 9) ist die

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) + 5 mM Glucose am spontanschlagenden Herzvorhof in Abhängigkeit von aufsteigenden Außenkonzentrationen (S)

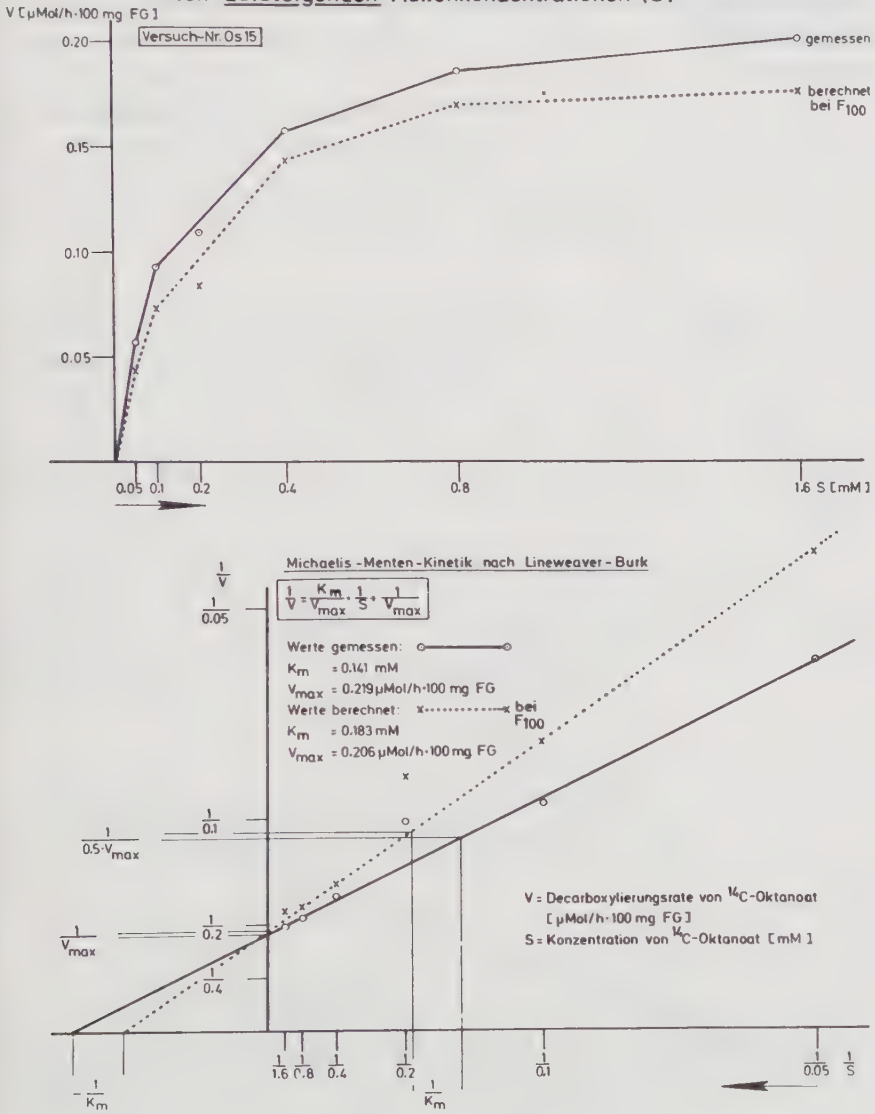


Abb. 9

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) + 5 mM Glucose am spontanschlagenden Herzvorhof in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S) (Mittelwerte aus 3 Versuchen)

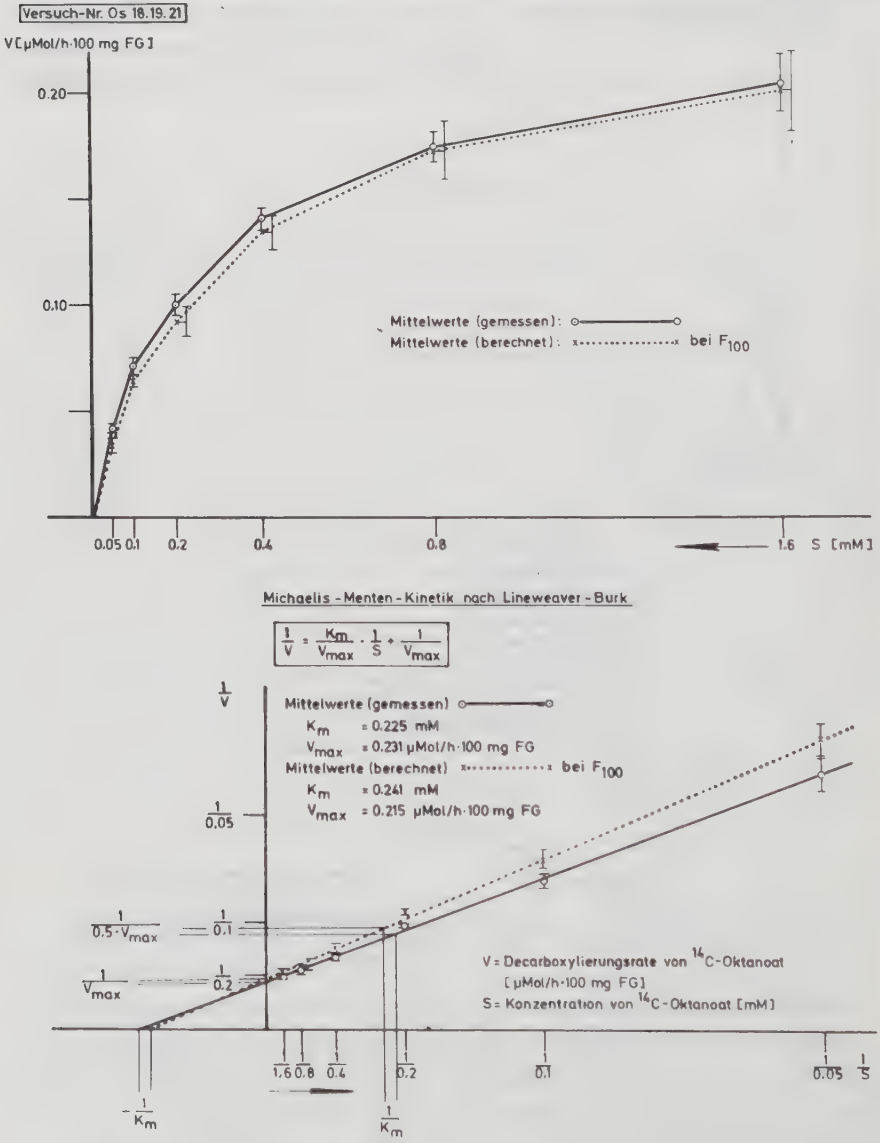


Abb. 10

Michaelis-Konstante bei ähnlichem V_{max} etwas erhöht. Die berechneten Werte liegen allerdings mit 0,18 und 0,24 mM in dem offensichtlich größeren Streubereich. Schon in Versuchen von SCHNEIDER (1970) wurden ebenfalls Änderungen der Daten der Michaelis-Menten-Kinetik gefunden, je nachdem ob auf- oder absteigende Konzentrationen untersucht, und dies auf den in den Langzeitversuchen schwindenden Glykogengehalt zurückgeführt wurde. Auffallend ist, daß sich in diesen Versuchen mit 5 mM Glucose die niedrigen Konzentrationen ebenfalls gut in die Kinetik einfügten.

b$_3$) Versuche am stillgestellten Herzvorhof mit absteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat: (Abb. 11)

Am stillgestellten Herzvorhof sollte geprüft werden, inwieweit sich K_m und V_{max} ändern. Aus der Mittelwertskurve der drei Versuche mit relativ großer Streuung kann man ein K_m von 0,13 mM bei einem relativ hohen V_{max} von 0,19 µMol/h·100 mg FG ablesen.

Da beim schlagenden Herzvorhof bei F_{100} ein V_{max} von etwa 0,21 µMol/h·100 mg FG gefunden wurde, könnte dies bedeuten, daß am stillgestellten Herzvorhof eine Verschiebung zur Verbrennung exogener Fettsäure stattfindet, wobei die Anteile aus dem Kohlenhydratstoffwechsel zurückgedrängt werden.

2. Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat an glykogenverarmten Herzvorhöfen ohne Glucose:

a. Versuche an spontanschlagenden Herzvorhöfen mit absteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen: (Abb. 12)

Nach den bisherigen Untersuchungen hatte man den Eindruck, daß die Glucose-Oxydation auch bei höheren Konzentrationen von Oktanoat einen stark konkurrierenden Einfluß ausübt und den Anteil von Oktanoat am Gesamt-O_2-Verbrauch herabsetzt. Um festzustellen, wie stark nach einer Glucoseverarmung und Inkubation in glucosefreiem Milieu sich dies auf die Kinetik auswirkt, wurden fünf Versuche durchgeführt und die Mittelwerte in Abbildung 12 dargestellt. Die Herzvorhöfe schlugen nach Glykogenverarmung bei

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) + 5 mM Glucose am stillgestellten Herzvorhof in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S) (Mittelwerte aus 3 Versuchen)

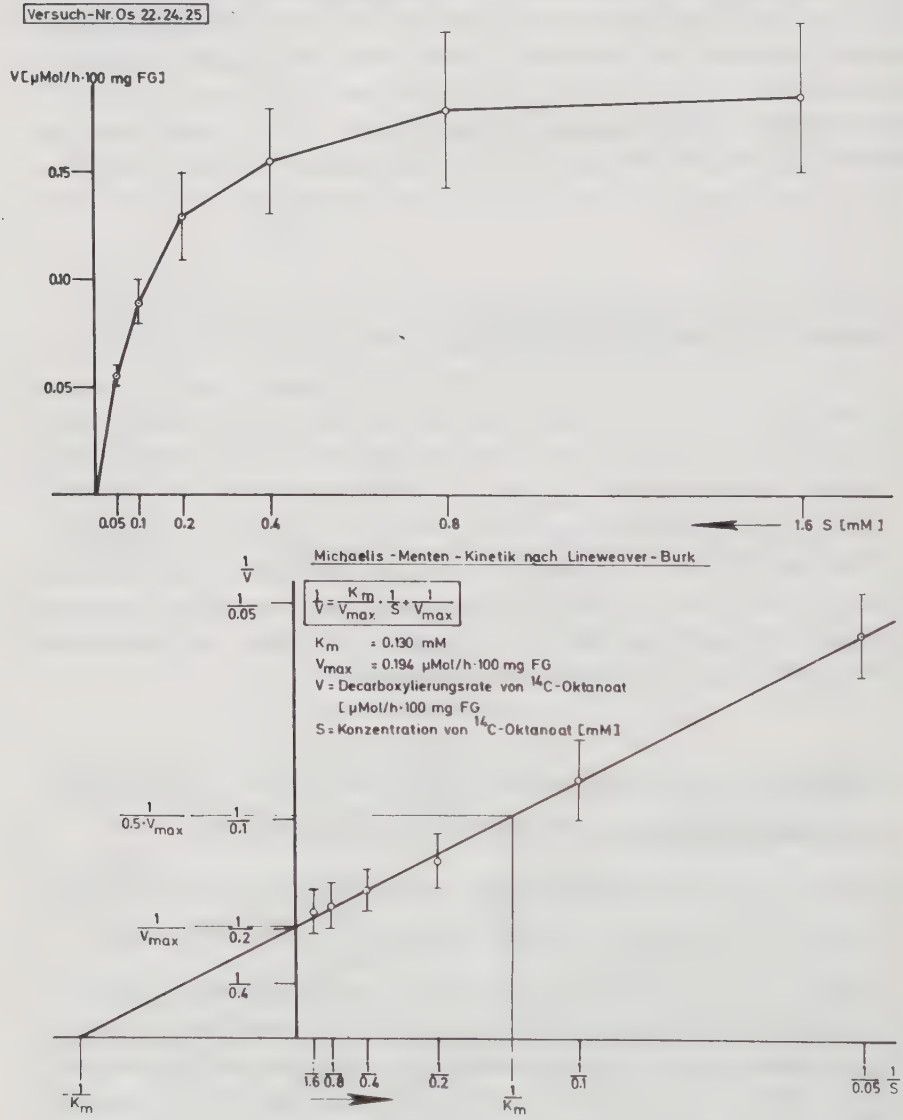


Abb. 11

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez.Akt. 1 µC/5 µMol) ohne Glucose am spontanschlagenden Herzvorhof in Abhängigkeit von ab-steigenden Außenkonzentrationen (S) nach Glykogen-Verarmung

(Mittelwerte aus 5 Versuchen)

Versuch-Nr. Os 31. 33. 34. 35. 36

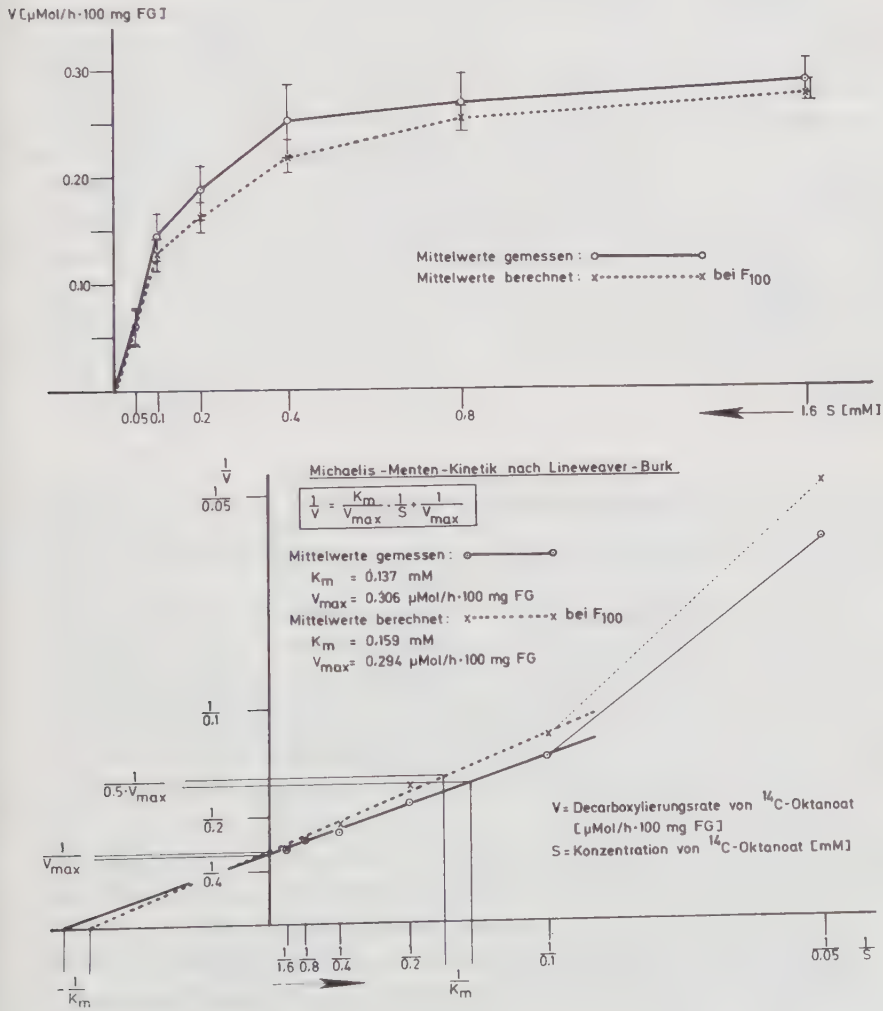


Abb. 12

Inkubation mit 1,6 mM ^{14}C-Oktanoat mit höherer Frequenz schlechter und verbesserten sich zunächst bei abnehmender Konzentration, wobei unter Senkung der Frequenz die Kontraktionskraft wieder zunahm. Bei 0,05 mM ^{14}C-Oktanoat sinkt aber die Leistung wieder ab. Da hier keine Konkurrenz mehr durch Kohlenhydrate zu erwarten ist, ist es nicht verwunderlich, daß bei 0,05 mM Oktanoat die nach Lineweaver-Burk bestimmten Werte relativ zu niedrig ausfallen. Hier reichte offensichtlich die Substratversorgung nicht mehr aus. Die Geraden für die gemessene und berechnete Kinetik liegen sehr nah zusammen und ergeben mit einem K_m von 0,14 bzw. 0,16 mM Werte, wie sie auch bei Kohlenhydrat-Anwesenheit beobachtet wurden. Wie zu erwarten war, liegt aber das V_{max} um etwa ein Drittel höher. Bei Inkubation mit 1,6 mM ^{14}C-Oktanoat und einer Frequenz von 100/min beträgt der mittlere Oktanoat-Umsatz 0,29 µMol/h·100 mg FG, was 3,2 µMol/h·100 mg FG Sauerstoff entspricht. Bei einem mittleren Sauerstoffverbrauch von 6,5 µMol/h·100 mg FG würde damit der Oktanoatanteil am Gesamt-O_2-Verbrauch nach Glykogenverarmung ansteigen.

b. Versuche an spontanschlagenden Herzvorhöfen mit absteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen und Stimulierung mit Orciprenalin: (Abb.13)

Um festzustellen, inwieweit eine Erhöhung der Herzleistung mit Orciprenalin am glykogenverarmten Herzvorhof die Kinetik beeinflußt, wurde in vier Versuchen unter Anwesenheit von Orciprenalin ($2 \cdot 10^{-6}$ g/ml) in der Nährlösung bei gesteigerter Frequenz und Kontraktionsamplitude die Kinetik aufgenommen. Die durchschnittliche Frequenz stieg dabei unter Orciprenalin im Konzentrationsbereich von 1,6 bis 0,4 mM ^{14}C-Oktanoat von 190 auf 225/min an. Weitere Verdünnung führte zwischen 0,2 und 0,05 mM zu einer starken Senkung der Leistung durch Frequenz- und Amplitudenabfall. Dies dürfte auf einem Energiemangel aus dem nicht mehr ausreichenden Substratangebot beruhen. Die gemessenen und berechneten Mittelwerte differieren in diesem Konzentraionsbereich deutlich. Nimmt man die Gerade über den Meßbereich von 0,05 bis 1,6 mM ohne Berücksichtigung des durch den Frequenzabfall zwischen 0,2 und 0,05 mM entstehenden Fehlers, so zeigt sich ein

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) ohne Glucose am spontanschlagenden Herzvorhof in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S) nach Glykogen-Verarmung

(Mittelwerte aus 4 Versuchen)

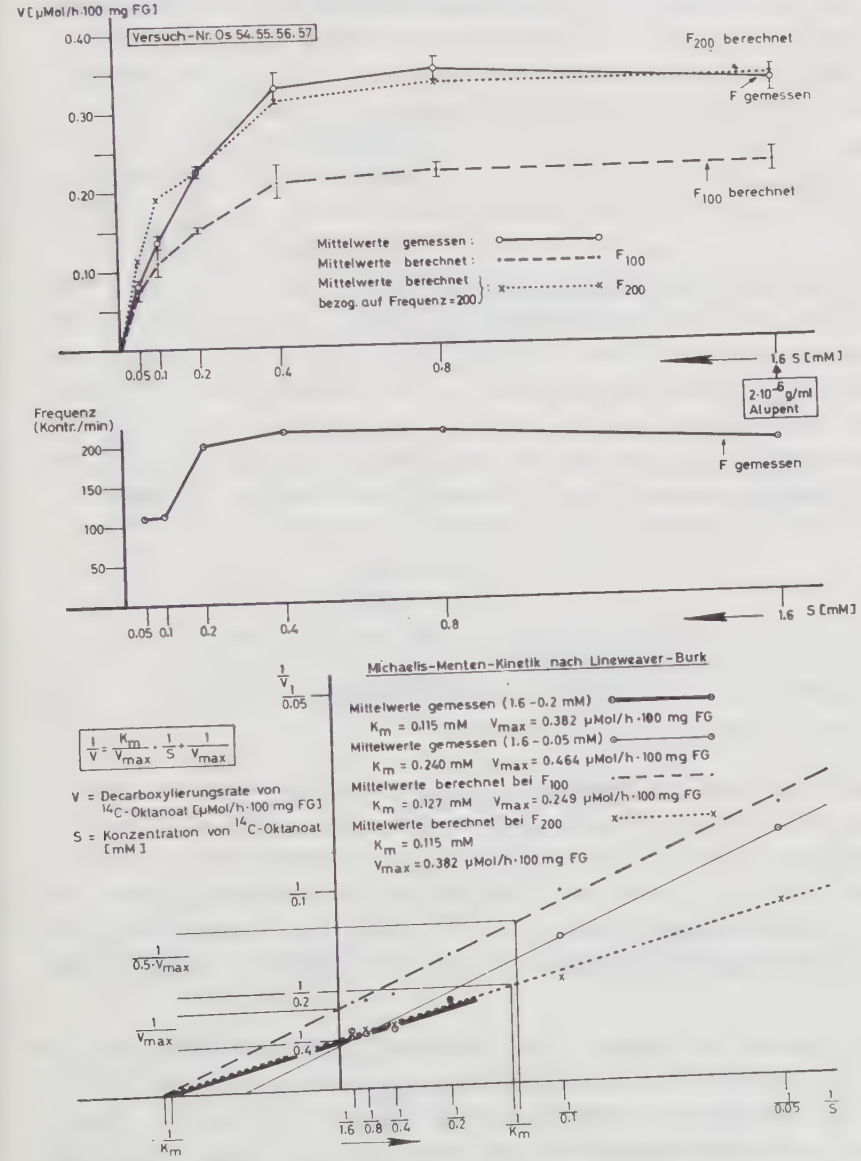


Abb. 13

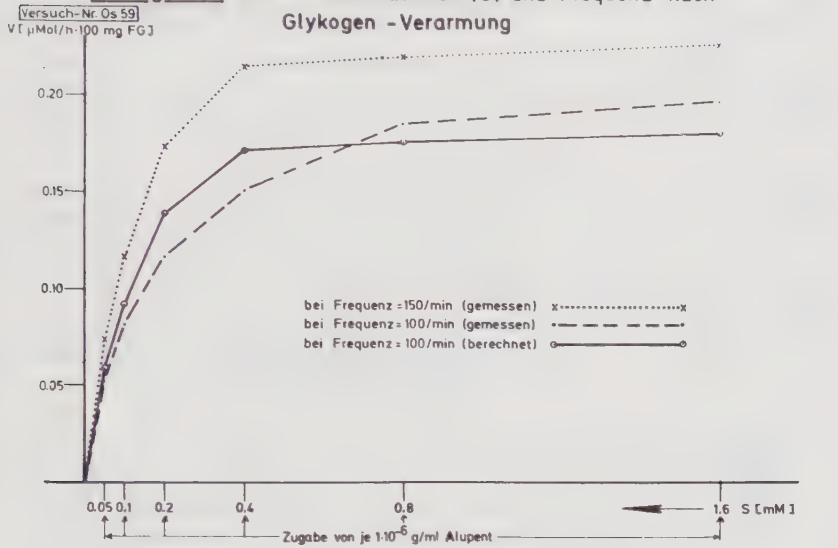
K_m von 0,24 mM und bei einem V_{max} von 0,46 µMol/h•100 mg FG, dem höchsten bisher gemessenen Wert. Legt man dagegen nur die Konzentrationen, bei denen die Frequenz von 200/min annähernd gehalten wurde (1,6 bis 0,2 mM), als Meßpunkte zugrunde, so ergibt sich praktisch eine Deckung mit den berechneten, korrigierten Werten über den Gesamtbereich von 0,05 bis 1,6 mM: Hier zeigte sich mit einem K_m von 0,12 mM und einem V_{max} (für F_{200}) von 0,38 µMol/h•100 mg FG, daß unter Orciprenalin bei praktisch völligem Fehlen des Kohlenhydratanteils Oktanoat etwas leichter eindringt und vermehrt in der Zelle oxydiert wird. Dem V_{max} entsprechen damit 4,2 µMol/h•100 mg FG O_2-Verbrauch. Da unter Orciprenalin der mittlere Gesamt-Sauerstoffverbrauch sicher wesentlich angestiegen ist, kann der prozentuale Anteil nicht berechnet werden. Rechnet man die Werte auf eine Frequenz von F = 100/min um, so bleibt die Michaelis-Konstante gleich, während der Wert von V_{max} in dem Streubereich der vorher beobachteten Werte nach Glykogenverarmung zu liegen kommt. Orciprenalin stimuliert also den Oxydations-Stoffwechsel nur in Abhängigkeit von der Leistung, wobei die Michaelis-Konstante unverändert bleibt.

c. Versuche an elektrisch stimulierten Herzvorhöfen bei absteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen und Zugabe von Orciprenalin: (Abb. 14 und 15)

Um die Wirkung von Orciprenalin bei elektrischer Reizung zu prüfen, wurden an zwei glykogenverarmten Herzvorhöfen Versuche durchgeführt. Hierbei wirkte Orciprenalin nur positiv inotrop, ohne die elektrisch gereizte Frequenz durch Extrasystolen zu verändern. Bei Konzentrationen von 1,6 mM bis 0,8 mM wird dabei eine leichte Kontrakturneigung beobachtet, die sich bei 0,4 mM wieder löst.

In Versuch Os 59 (Abb. 14) sind die Michaelis-Konstanten bei beiden Reiz-Frequenzen nicht erhöht; V_{max} von F_{100} entspricht den Werten bei Glykogenverarmung. In Versuch Os 61 (Abb. 15), der in gleicher Weise durchgeführt wurde, ergibt sich dagegen mit einem K_m von 0,27 bis 0,33 mM eine deutliche Erhöhung, wie es auch früher bei elektrisch gereizten Herzvorhöfen beobachtet wurde.

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) am elektrisch stimulierten Herzvorhof (1.0 ms/2.0 mA) in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S) und Frequenz nach Glykogen-Verarmung



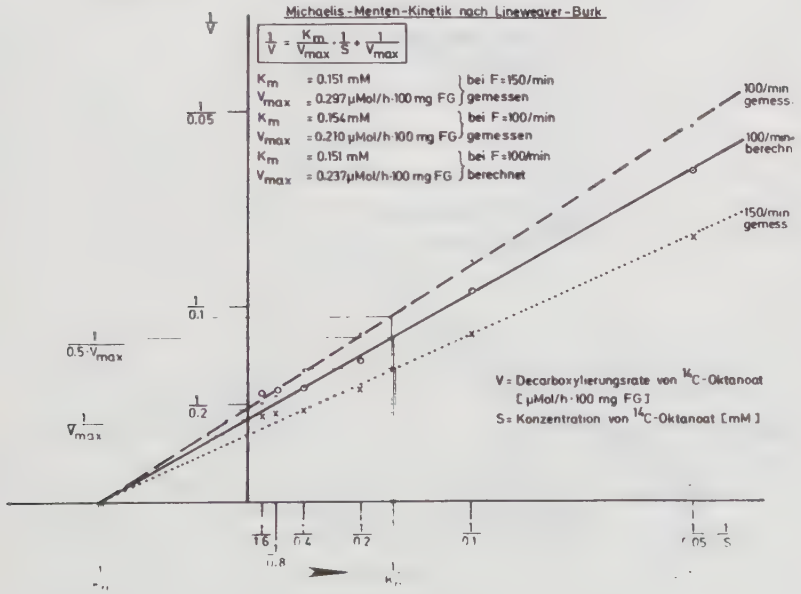


Abb. 14

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez.Akt. 1 µC/5 µMol) am elektrisch stimulierten Herzvorhof (1.0 ms/2.0 mA) in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S) und Freqrenz nach Glykogen-Verarmung

Versuch-Nr. Os 61

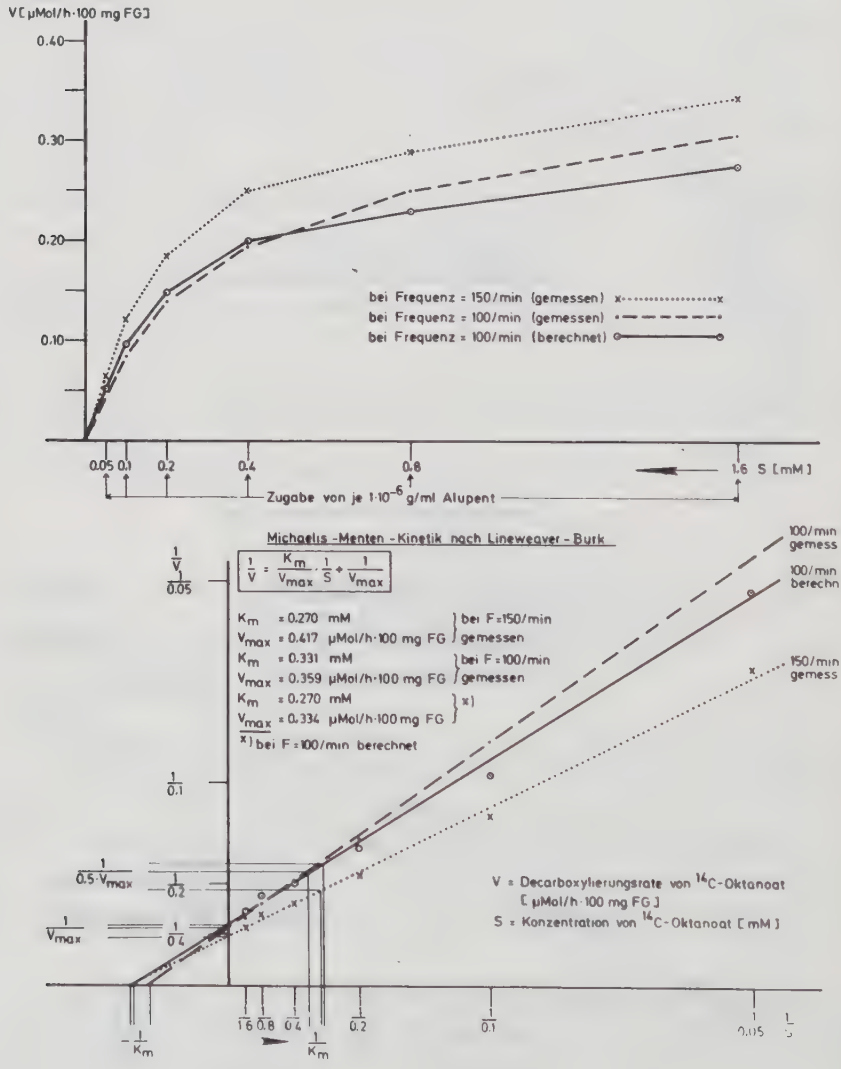


Abb. 15

V_{max} liegt mit 0,42 µMol/h·100 mg FG bei 150/min und mit 0,36 µMol pro h und 100 mg FG bei 100/min wesentlich höher. In beiden Versuchen stimmten die Michaelis-Konstanten der berechneten mit der gemessenen Kinetik gut überein.

Der Unterschied beider Versuche könnte darin liegen, daß im Versuch Os 59 (Abb. 14) die Glykogenverarmung noch nicht vollständig und dadurch Oktanoat nicht einziges Substrat war.

Auffallend ist, daß bei der Konzentration von 1,6 mM Oktanoat und der Frequenz 100/min der Oktanoatumsatz am glykogenverarmten Herzvorhof mit 0,27 µMol/h·100 mg FG ähnliche Werte aufwies wie am spontanschlagenden Herzvorhof nach Glykogenverarmung. V_{max} und K_m waren aber unter Orciprenalin bei Glykogenverarmung am elektrisch stimulierten Herzvorhof erhöht.

d. Versuche am stillgestellten Herzvorhof mit absteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen: (Abb. 16)

In zwei Versuchsserien mit je drei Versuchen wurde am stillgestellten Herzvorhof nach Glykogenverarmung mit absteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Oktanoat die Kinetik bestimmt. Aus Abbildung 16 (oben) geht hervor, daß sich beide Versuchsserien ähnlich verhalten; nur die Höhe der Oxydationsrate ist verschieden. Während der spontanschlagende Herzvorhof nach Glykogenverarmung bei F_{100} und 1,6 mM Oktanoat einen Substratumsatz von etwa 0,29 µMol/h und 100 mg FG zeigt (Abb. 12), beträgt dieser am stillgestellten Herzvorhof nur 0,18 bzw. 0,22 µMol/h·100 mg FG.

Lineare Beziehungen der Kinetik nach Lineweaver-Burk lassen sich nur schwer erkennen. Es zeigt sich wohl ein deutlicher Abfall entsprechend der sinkenden Konzentration (Abb. 16, unten), doch läßt sich in beiden Versuchen nur im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 und 0,8 mM eine Gerade ziehen, die sich auf der Abszisse in einer gemeinsamen Michaelis-Konstanten treffen: K_m=0,18mM, was sich mit den am spontanschlagenden Herzvorhof gefundenen Werten in Übereinstimmung befinden würde. V_{max} differiert zwischen 0,18 und 0,22 µMol/h·100 mg FG, ist also gegenüber dem V_{max} des schlagenden Herzvorhofs (V_{max} = 0,31 µMol/h.100 mg FG, Abb. 12)

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) ohne Glucose am stillgestellten Herzvorhof in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S) nach Glykogen-Verarmung

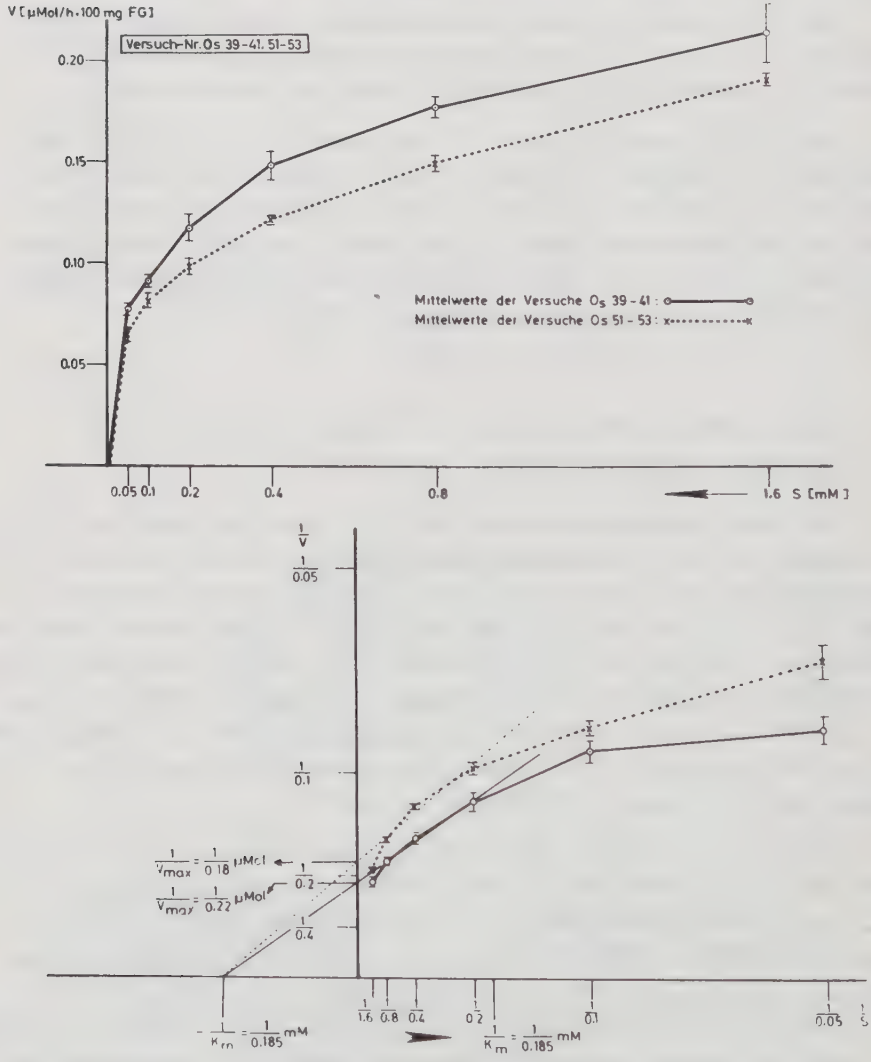


Abb. 16

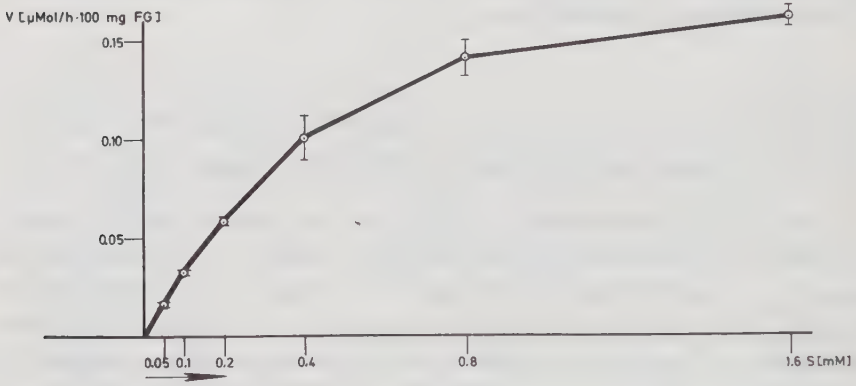
deutlich herabgesetzt. Möglicherweise kommt es unter den hohen Konzentrationen der Fettsäure zu einer erhöhten Oxydation im Sinne einer Entkoppelung wie es später in verstärktem Maße auch bei niedrigen Konzentrationen von Dekanoat beobachtet wurde, und wofür auch die Steigerung der ^{14}C-Hexanoat-Oxydation nach Zusatz von Oktanoat spricht. Damit stimmt überein, daß die Umsatzrate bei 1,6 mM Oktanoat überhöht ist.

e. Versuche am stillgestellten, glykogenverarmten Herzvorhof mit aufsteigenden ^{14}C-Oktanoat-Konzentrationen: (Abb. 17)

Nach Glykogenverarmung zeigt sich bei aufsteigenden Konzentrationen mit Oktanoat eine Kinetik mit einem K_m von 0,88 mM und einem V_{max} von 0,30 µMol/h·100 mg FG. Dieser starke Unterschied zwischen den Befunden bei auf- und absteigenden Konzentrationen ist schwer zu deuten. Man könnte an eine Energiemangel-Schädigung des Herzvorhofs durch die anfänglich zu niedrige Konzentration bei fehlendem Kohlenhydrat denken. Tatsächlich liegt auch bei 1,6 mM Oktanoat die Umsatzrate mit 0,15 µMol/h·100 mg FG noch wesentlich niedriger als bei absteigenden Konzentrationen (0,22 µMol/h·100mg FG), wo dieser Wert zuerst bestimmt wurde. Nimmt man an, daß bis zu einer Konzentration von 0,4 mM durch Energiemangel ein Teil der Zellen abgestorben ist, und dadurch ein zu niedriger Umsatz registriert wird, so wird verständlich, daß die noch lebenden Zellen erst bei höherer Konzentration zwischen 0,4 und 1,6 mM eine stärkere Oxydation zeigen. Tatsächlich besteht zwischen diesen drei Punkten eine annähernd lineare Verbindung mit einem V_{max} von 0,2µMol pro h und 100 mg FG und einem K_m von 0,44 mM, was für diese Deutung sprechen würde. Das erhöhte K_m würde für einen erschwerten Eintritt von Oktanoat in den Stoffwechsel sprechen.

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) am stillgestellten Herzvorhof nach Glykogen-Verarmung in Abhängigkeit von aufsteigenden Außenkonzentrationen (S)

Versuch-Nr. Os 48.49.50



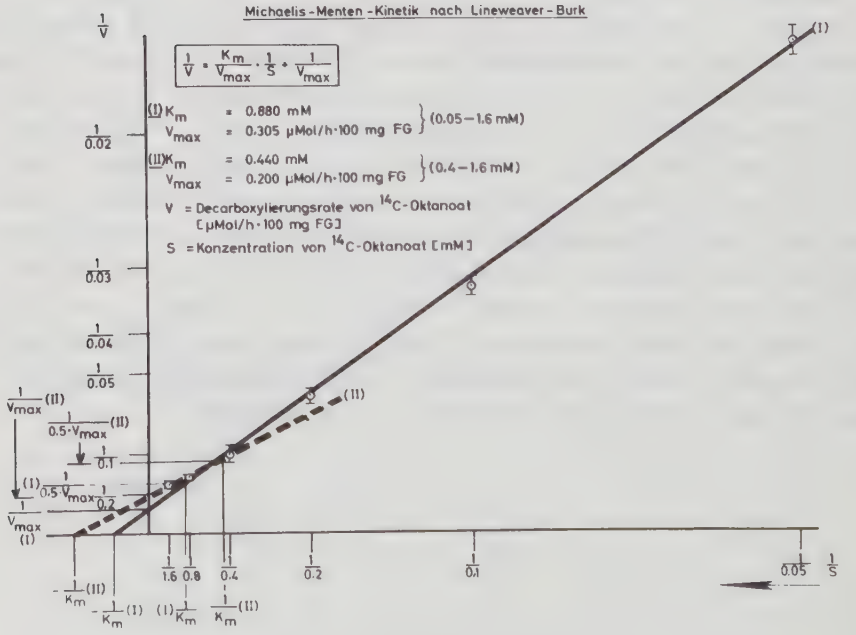


Abb. 17

3. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Oktanoat am stillgestellten Herzvorhof:

a. Mit aufsteigenden Konzentrationen von Hexanoat: (Abb. 18)

Wartet man das Decarboxylierungsgleichgewicht bei Inkubation mit 1,6 mM ^{14}C-Oktanoat nach Stillstellen des Herzvorhofes ab, so senkt sich die Umsatzrate von 0,39 auf 0,19 µMol/h·100 mg FG (-50 %), wie es auch den Berechnungen entspricht. Gibt man nun aufsteigende Konzentrationen von nicht-markiertem Hexanoat hinzu, so zeigt sich sehr deutlich eine weitere Senkung der Decarboxy - lierungsrate. Diese geht nicht linear entsprechend einer Ver - dünnung, sondern biegt bei 2 mM Hexanoat allmählich in eine Gerade ein. Bei dieser Konzentration besteht eine Rest-Decarb - oxylierung von rund 15 % Oktanoat (für 1,6 mM = 13 %; für 0,8 mM = 14 %; für 0,4 mM = 9 %).

Prüft man diese Hemmwirkung von Hexanoat für die Konzen - tration von 1,6 mM; 0,8 mM und 0,4 mM ^{14}C-Oktanoat und setzt die jeweiligen Decarboxylierungswerte nach Stillstand gleich 100 %, so zeigt sich auch hier, daß der prozentuale Abfall mit auf - steigender Konzentration von Hexanoat ähnlich verläuft wie bei der hohen Konzentration von 1,6 mM. Allerdings besteht in den niedrigeren Konzentrationen von 0,25 bis 0,5 mM Hexanoat ein Unterschied. Hier ist der Abfall konzentrationsabhängig größer, d. h. bei niedrigen Oktanoat-Konzentrationen hemmt Hexanoat den Oktanoat-Stoffwechsel deutlich stärker (Abb. 18, oben), während bei den hohen Konzentrationen von 1,0 bis 2,0 mM Hexanoat die prozentualen Hemmwerte praktisch zusammenfallen. Diese Unter - schiede in den Konzentrationsbereichen werden auch deutlich, wenn man eine Analyse nach Lineweaver-Burk und nach Dixon durchführt.

Aufgetragen nach Lineweaver-Burk (Abb. 18, Mitte) besteht im Konzentrationsbereich zwischen 1,6 und 0,8 mM ^{14}C-Oktanoat, bzw. zwischen 1,5 und 2,0 mM Hexanoat als Inhibitor ein kompe - titiver Hemmungsmechanismus, während zwischen 1,6 und 0,4 Oktanoat und der niedrigen Konzentration des Inhibitors (0,25 bis 1,0 mM Hexanoat) eine " partial kompetitive" Hemmung vorzuherrschen scheint. Der Schnittpunkt der Geraden liegt allerdings derart nahe an der negativen Abszisse, daß man entsprechend nach WEBB

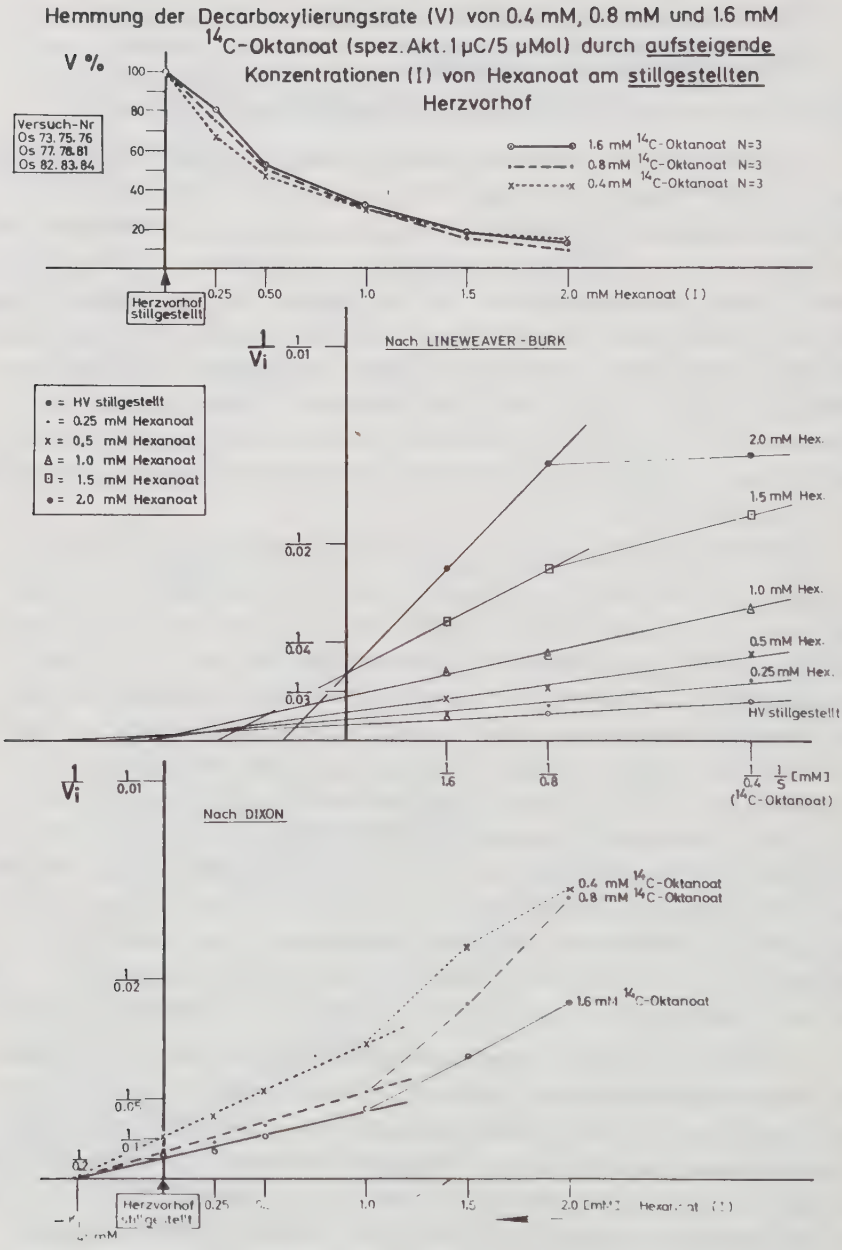

Hemmung der Decarboxylierungsrate (V) von 0.4 mM, 0.8 mM und 1.6 mM ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) durch aufsteigende Konzentrationen (I) von Hexanoat am stillgestellten Herzvorhof
V %
Versuch-Nr
Os 73. 75. 76
Os 77. 78. 81
Os 82. 83. 84
1.6 mM ^{14}C-Oktanoat N=3
0.8 mM ^{14}C-Oktanoat N=3
0.4 mM ^{14}C-Oktanoat N=3
Herzvorhof stillgestellt
0.25 0.50 1.0 1.5 2.0 mM Hexanoat (I)
Nach LINEWEAVER-BURK
• = HV stillgestellt
· = 0.25 mM Hexanoat
x = 0,5 mM Hexanoat
Δ = 1.0 mM Hexanoat
□ = 1.5 mM Hexanoat
• = 2.0 mM Hexanoat
2.0 mM Hex.
1.5 mM Hex.
1.0 mM Hex.
0.5 mM Hex.
0.25 mM Hex.
HV stillgestellt
Nach DIXON
0.4 mM ^{14}C-Oktanoat
0.8 mM ^{14}C-Oktanoat
1.6 mM ^{14}C-Oktanoat
Herzvorhof stillgestellt

Abb. 18

auch von einer kompetitiven Hemmung in Bezug auf einen Aktivator sprechen könnte. Dafür spricht, daß, nach Dixon (Abb. 18, unten) aufgetragen, für den gleichen Konzentrationsbereich der Schnitt - punkt mit der Abszisse für diesen Hemmungstyp sprechen würde. Nimmt man keinen Aktivator an, so spricht der Schnittpunkt beider Auftragungsarten für eine nicht-kompetitive Hemmung. Zweifellos zeigt sich in diesen Versuchen, daß die Deutung dieser Hemm - vorgänge entsprechend einem Multi-Enzym-System, wie es die Zelle darstellt, komplex ist, und daß offensichtlich in verschiedenen Konzentrationsbereichen differente Mechanismen vorherrschen. Es müssen dabei auch noch Beeinflussungen beim Membrandurchtritt beider Fettsäuren in Betracht gezogen werden.

Würde man nach Dixon den Schnittpunkt auf der Abszisse mit K_i ansetzen, so beträgt dieser Wert 0,45 mM. In Abbildung 18 (oben) beträgt die maximal erreichbare Hemmung mit Hexanoat bei 1,6 mM 15 % des Ausgangswertes, entspricht also einer maximalen Hemmung von 85 %. Nimmt man davon 50 %, so läge diese halbmaximale Hemmung bei 58 %. Die entsprechende 50 %ige Hemmkonzentration ist analog dem nach Dixon gefundenen wert für die Konzentration von 1,6 mM bis 0,4 mM ^{14}C-Oktanoat = 0,45 mM.

Nachdem in den Versuchen mit ^{14}C-Oktanoat gezeigt werden konnte, daß Zusatz von Hexanoat zu einer beträchtlichen Hemmung der Oxydation dieses Substrates führte, muß demnach Hexanoat eine wesentlich höhere Affinität zu CoA besitzen als Oktanoat. Ob der beobachtete kompetitive Hemmungsmechanismus bei hohen Konzentra - tionen bei Durchtritt durch die Membran erfolgt oder erst im Stoffwechsel, kann nicht entschieden werden.

b. Mit aufsteigenden Konzentrationen von Glucose: (Abb. 19)

Um festzustellen, ob die Decarboxylierungsrate bei Inkubation mit 1,6 mM ^{14}C-Oktanoat am nicht-glykogenverarmten Herzvorhof durch Zusatz von Glucose verändert wird, wurden aufsteigende Kon - zentrationen von 2,5; 5,0 und 10,0 mM inaktive Glucose zugegeben. Es zeigte sich dabei, daß eine anfänglich auftretende Systoli - sierung durch Glucosezusatz rückgängig gemacht wurde, wobei die

Die Einwirkung aufsteigender Konzentrationen (I) von Glucose auf Decarboxylierungsrate (V), Frequenz (F) und Kontraktionsarbeit pro Schlag (E_S) bei Inkubation mit 1.6 mM ^{14}C-Oktanoat (spez. Akt. 1 µC/5 µMol) am spontanschlagenden Herzvorhof.

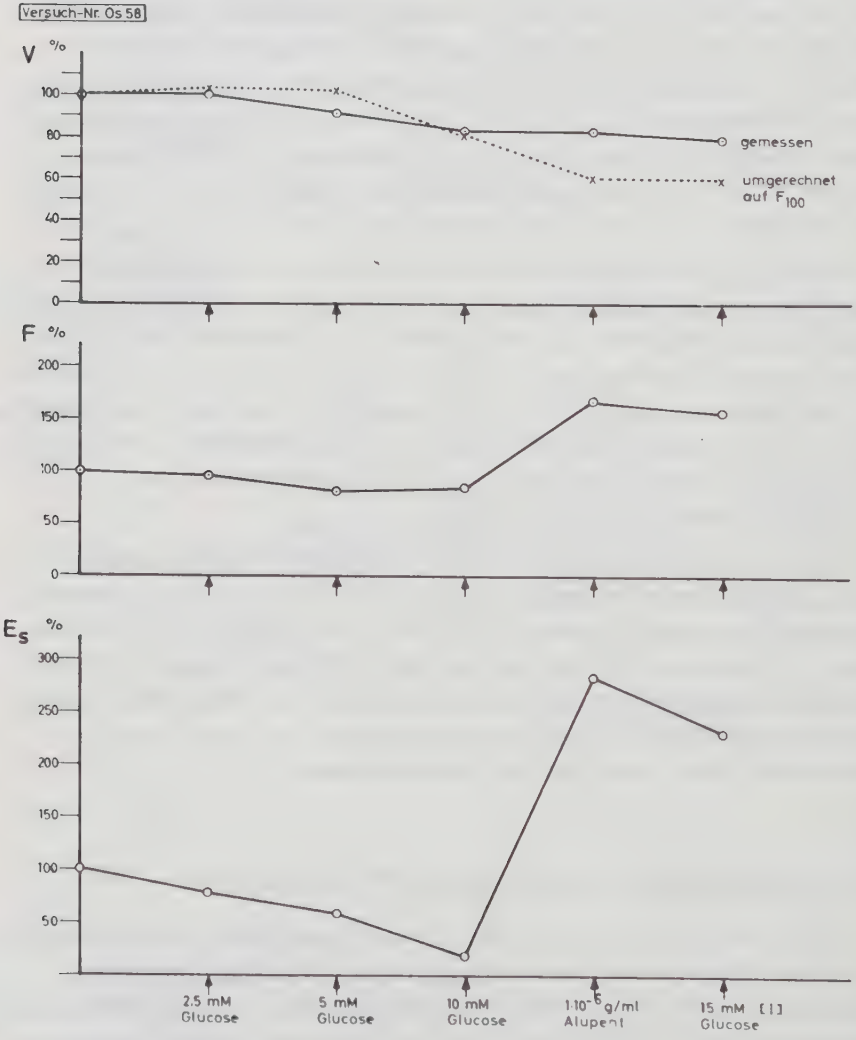


Abb. 19

erhöhte Frequenz allmählich absank. Die Decarboxylierungsrate ging entsprechend der Frequenz ebenfalls langsam zurück. Wurde nun bei der hohen Konzentration von 10 mM Glucose der Herzvorhof mit Orci - prenalin ($2 \cdot 10^{-6}$ g/ml) maximal stimuliert, so zeigte sich interes - santerweise trotz der starken Frequenzsteigerung nur eine gering - gradige Erhöhung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Oktanoat. Diese ging nach etwa einer Stunde sogar etwas unter den Ausgangswert zurück. Erhöhung auf 15 mM Glucose senkte die Decarboxylierungs - rate nicht weiter.

Rechnet man die Decarboxylierungsrate auf eine Einheits - frequenz von F_{100} um, so wird deutlich, daß die Decarboxylierungs - rate der C_8-Fettsäure bereits durch Zusatz von 10 mM Glucose offen - sichtlich herabgesetzt wird und bei Funktionssteigerung durch Orciprenalin um 40 % gegenüber dem Ausgangswert zurückgedrängt wird. Weitere Erhöhung auf 15 mM Glucose hat auf die Umsatzrate von ^{14}C-Oktanoat keinen weiteren Einfluß mehr. Auch ohne Orci - prenalin senkt also Zusatz von 10 mM Glucose die Decarboxylie - rungsrate von Oktanoat deutlich. Dies ist ein wesentlicher Unter - schied gegenüber Hexanoat, bei dem nie eine Herabsetzung, sondern sogar eine leichte Steigerung durch Glucosezusatz als Folge einer positiv ino- und chronotropen Wirkung gefunden wurde. Erst bei Stimulierung mit Adrenergika wird auch bei Hexanoat-Inkubation eine Verschiebung zur Kohlenhydratoxydation beobachtet.

4. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose durch Oktanoat:

a. Am stillgestellten und am spontanschlagenden Herzvorhof bei Inkubation mit 7,5 und 15 mM ^{14}C-Glucose: (Abb. 20)

Um festzustellen, inwieweit die Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose durch Oktanoat gehemmt werden kann, wurden sowohl am schlagenden, wie auch am stillgestellten Herzvorhof nach Einstel - lung des Decarboxylierungsgleichgewichtes bei Inkubation mit 15 mM ^{14}C-Glucose aufsteigende Konzentrationen von 0,05 bis 3,2 mM Okta - noat zugegeben und die Funktion sowie die Umsatzrate bestimmt.

Hemmung der Decarboxylierungsrate (V) von 7.5 mM und 15 mM ^{14}C-Glucose (spez. Akt. 1 µC/10 µMol) durch aufsteigende Konzentrationen (I) von Oktanoat am spontanschlagenden und stillgestellten Herzvorhof

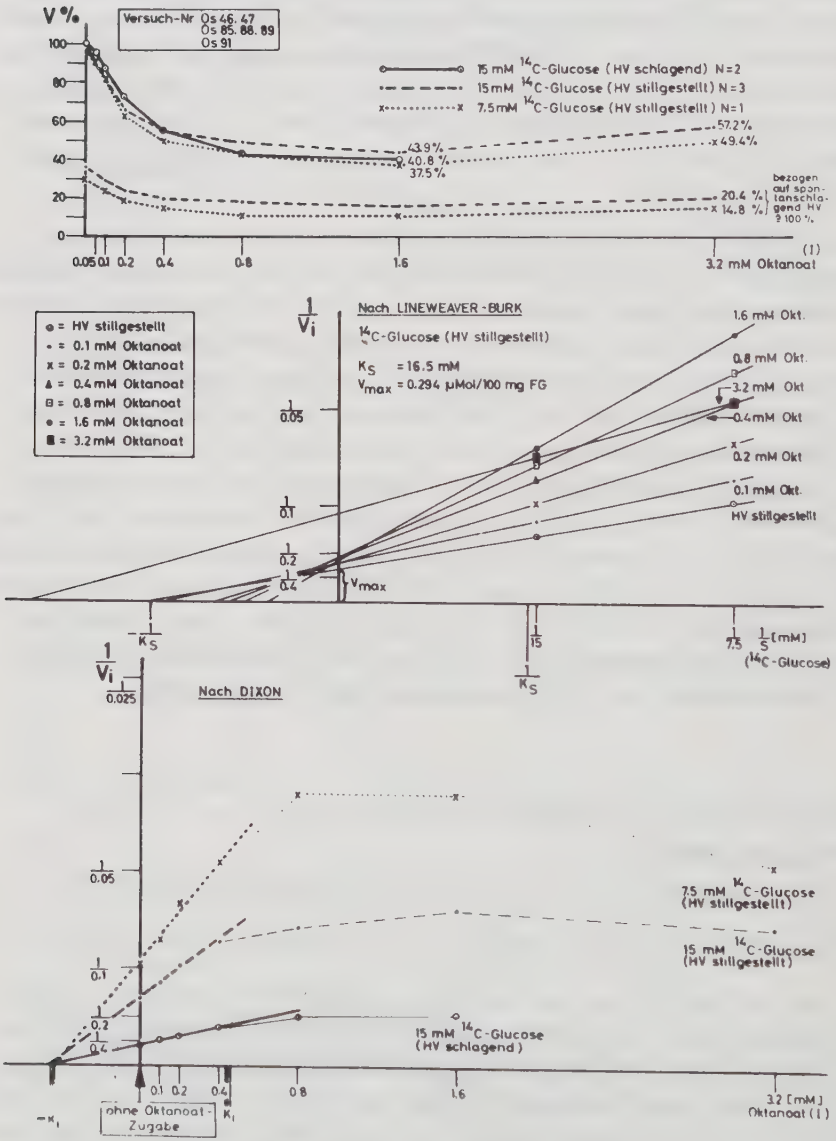


Abb. 20

Am schlagenden Herzvorhof beeinflusst hier der Zusatz von Oktanoat zunehmend die Leistung: Die ursprünglich hohe Kontraktionsamplitude sinkt, die Frequenz fällt zwischen 0,05 und 1,6 mM Oktanoat im Mittel von 124/min auf 69/min ab; also gerade umgekehrt wie bei absteigenden Oktanoat-Konzentrationen. Eine Kontraktur tritt jedoch nicht ein. Die Decarboxylierungsrate fällt im Konzentrationsbereich zwischen 0,05 und 0,8 mM steil ab; die Frequenz aber erst zwischen 0,4 und 1,6 mM. Um den frequenzbedingten Abfall der Decarboxylierungsrate zu korrigieren, wurden die Werte auf F = 100/min umgerechnet. Dabei zeigte sich sehr deutlich, daß die Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose im Bereich zwischen 0,05 und 0,8 mM Oktanoat steil abfällt und bei Erhöhung der Konzentration auf 1,6 mM die Hemmwirkung nicht mehr verstärkt wird. Es bleibt eine Rest-Decarboxylierungsrate von 40,8 % bestehen.

In drei Versuchen wurde zuerst bei Inkubation mit 15 mM ^{14}C-Glucose das Decarboxylierungsgleichgewicht am schlagenden Herzvorhof abgewartet und dann mit 20 mM KCl stillgestellt. Ähnlich wurde in einem Versuch mit 7,5 mM ^{14}C-Glucose verfahren. Auch hier wurden die Ausgangswerte (= 100 %) auf die Frequenz F = 100/min umgerechnet. Es fiel dabei auf, daß im Unterschied zu den Untersuchungen mit den Fettsäuren nach Stillstand die Decarboxylierungsrate nicht nur auf 50 %, sondern auf 60 und 70 % des F_{100}-Wertes abfiel (Abb. 20, oben). Zugabe von Oktanoat führte in ganz ähnlichem Konzentrationsbereich und ähnlicher Stärke eine weitere Hemmung der Glucose-Oxydation herbei. Dabei zeigte sich der prozentuale Abfall bei Inkubation mit 7,5 mM gegenüber 15 mM nur im Bereich zwischen 0,2 und 1,6 mM Oktanoat deutlich verstärkt. Setzt man die Ausgangswerte nach Stillstand gleich 100 % (Abb. 20, oben), so ergibt sich bei 1,6 mM Oktanoat und 15 mM Glucose eine Rest-Glucose-Oxydation von 44 %, bei Inkubation mit 7,5 mM nur von 37,5 %; entsprechend 20,4 bzw. 14,8 % des schlagenden Herzvorhofes. Die Analyse des Hemmvorgangs nach Lineweaver-Burk und Dixon (Abb. 20, Mitte und unten) ergibt für den Bereich von 0,1 bis 1,6 mM Oktanoat und 7,5 und 15 mM Glucose einen Schnittpunkt der Geraden dicht hinter der Ordinatenachse und entspricht einem teilkompetitiven Hemmungsmechanismus.

Trägt man nach Dixon die Inhibitor-Konzentration linear gegen den reziproken Wert der gehemmten jeweiligen Decarboxylierungs - rate auf, so ergibt sich für den Bereich zwischen 0,1 und 0,4 mM Oktanoat am schlagenden und stillgestellten Herzvorhof bei 15 mM Glucose, sowie auch bei stillgestelltem Herzvorhof bei 7,5 mM Glucose, ein Schnittpunkt der drei Geraden mit der negativen Abszissenachse. Dies würde einem K_i von 0,45 mM entsprechen. Vergleicht man diesen K_i-wert mit den linear aufgetragenen Werten in Abbildung 20 (oben), so entspricht er genau einer 50 %igen Hemmung der gesamten Decarboxylierungsrate. Die Umsatzrate beträgt nach maximaler Hemmung mit Oktanoat 40 % des Ausgangswertes; halb - maximale Hemmung wäre also bei 70 % zu beobachten. Nach Abbil - dung 20 (oben), entspricht dies einer Inhibitor-Konzentration von 0,18 mM, der Michaelis-Konstanten der Oktanoat-Oxydation.

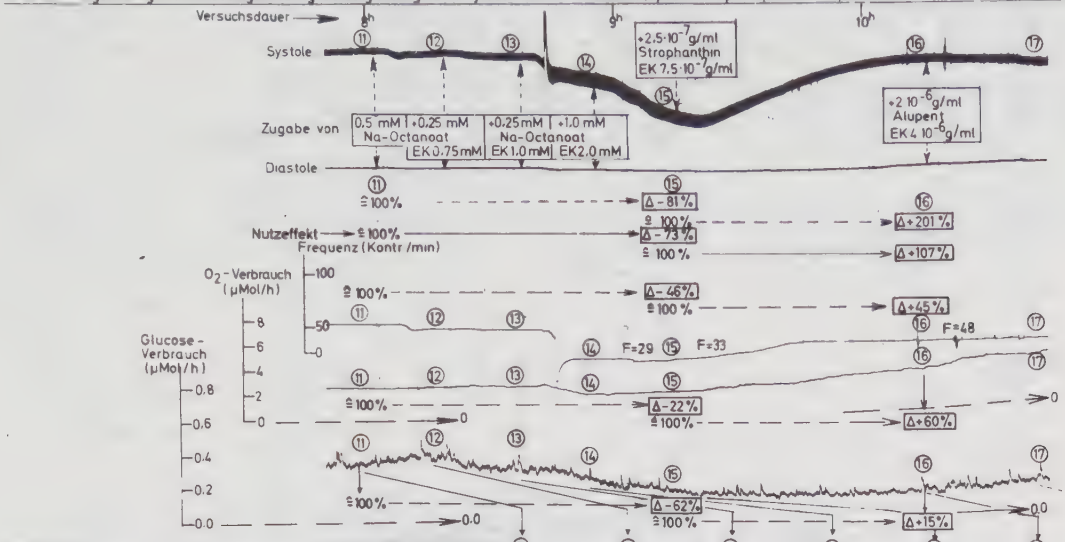
Die Hemmungsmechanismen zwischen Glucose und Oktanoat sind zweifellos komplizierter als zwischen Glucose und Hexanoat: So führt z. B. ein Zusatz von 3,2 mM Oktanoat am stillgestellten Herzvorhof zu einer Erhöhung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose (Abb. 20, oben). Nach SIESS, KELLER et al. (1970) be - trägt bei Inkubation mit 15 mM Glucose der Anteil exogenen Sub - strates 55 %. Bei Zusatz von Oktanoat könnte es nicht nur zu einer Konkurrenz mit exogener ^{14}C-Glucose, sondern auch mit nicht-markierter, aus dem Glykogen stammender Glucose kommen. Es wäre daher vorstellbar, daß bei hohen Konzentrationen von Okta - noat der aus dem Glykogen stammende Anteil am Gesamt-O_2-Verbrauch durch Oktanoat direkt gehemmt und daher die Oxydation von exogener ^{14}C-Glucose verstärkt wird. Wahrscheinlich ist aber, wie die spä - teren Versuche mit Dekanoat zeigen, eine Zunahme des Sauerstoff - verbrauchs hier Folge einer entkoppelnden Wirkung.

b. Am spontanschlagenden Herzvorhof mit Bestimmung des O_2-Ver - brauches: (Abb. 21 und 22)

Um festzustellen, inwieweit Na-Oktanoat die Decarboxylierungs- rate von Glucose und den Sauerstoffverbrauch am schlagenden Herz - vorhof beeinflußt, wurde in Versuch MK 38/2 (Abb. 21) nach Ein -

Die Wirkung von Na-Oktanoat nach vorheriger Zugabe von l-Propranolol (Dociton®), Orciprenalin (Alupent®) und g-Strophanthin bei Inkubation mit ^{14}C-Glucose

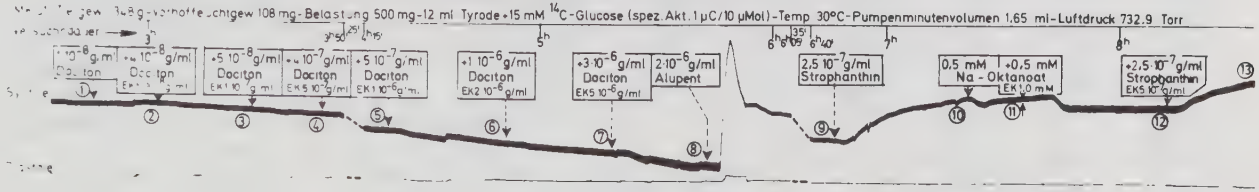
M-K 38/2 - T.ergew. 296 g - Vorhoffeuchtgew. 92 mg - Belastg. 500 mg - 12 ml Tyrode + 15 mM ^{14}C-Glucose (spez. Akt. 1 µC/10 µMol) - Pumpenminutenvol. 1.65 ml - Luftdruck 725.5 Torr - Temp. 30°C



Meßpunkt (Δ bezogen auf Mp I-V 38/1)		⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰
E = Leistung (cm g/h)		314.76	292.32	273.26	124.03	65.93	218.88	219.00
	ΔE →	+16.6%	+8.3%	+1.2%	-54.0%	-75.6%	-18.9%	-18.8%
F = Frequenz (Kontraktionen/min)		61	58	57	32	33	48	50
	ΔF →	-19.7%	-23.7%	-25.0%	-57.9%	-56.6%	-36.8%	-34.2%
Sauerstoffverbrauch (µMol/h und Vorhof)		2.68	2.68	2.68	1.93	2.10	3.36	3.86
	ΔO2 →	-20.0%	-20.0%	-20.0%	-42.5%	-37.5%	±0.0%	+15.0%
D = Decarboxylierung v ^{14}C-Glucose (Anteil am Gesamt-O_2-Verbrauch)		0.34 (76.9%)	0.39 (87.9%)	0.29 (65.9%)	0.20 (61.2%)	0.13 (38.7%)	0.15 (26.4%)	0.19 (29.6%)
(µMol/h und Vorhof)	ΔD →	-3.4%	+10.3%	-17.2%	-44.8%	-62.1%	-58.6%	-46.5%
U = Nutzeffekt (%)		6.53	6.06	5.67	3.58	1.75	3.63	3.16
	ΔU →	+45.7%	+35.3%	+26.6%	-20.1%	-60.9%	-19.0%	-29.5%

Abb. 21

Die Eigenwirkung von d-Propranolol (Dociton®) mit nachfolgender Zugabe von Orciprenalin (Alupent®), g-Strophanthin und Na-Octanoat bei Inkubation mit ^{14}C-Glucose



Meßpunkt	Δ bezogen auf Mp. 1	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬
E = Leistung (cm g/h)		220.05	220.05	202.46	185.71	133.56	91.65	61.56	28.48	135.19	311.10	286.37	210.60	321.20
	ΔE →		± 0.0%	-8.0%	-15.6%	-39.3%	-58.3%	-72.0%	-87.0%	-38.6%	+41.4%	+30.1%	-4.3%	+45.9%
F = Frequenz (Kontraktionen/min)		75	75	74	73	70	65	60	47	86	85	76	65	67
	ΔF →		± 0.0%	-1.3%	-2.7%	-6.7%	-13.3%	-20.0%	-37.3%	+14.7%	+13.3%	+1.3%	-13.3%	-10.7%
Sauerstoffverbrauch (µMol/h und Vorhof)		3.84	3.84	3.91	3.99	3.69	3.47	3.18	2.66	3.99	4.43	4.58	4.28	4.87
	ΔO2 →		± 0.0%	+1.9%	+3.8%	-3.8%	-9.6%	-17.3%	-30.8%	+3.8%	+15.4%	+19.2%	+11.5%	+26.9%
D = Decarboxylg v. ^{14}C-Glucose (µMol/h und Vorhof)	(Anteil am Gesamt-O_2-Verbrauch)	0.47 (73.0%)	0.47 (73.0%)	0.47 (71.6%)	0.47 (70.3%)	0.44 (71.9 %)	0.42 (72.3%)	0.37 (72.0%)	0.34 (77.7%)	0.52 (77.8%)	0.57 (76.6%)	0.54 (70.9%)	0.40 (66.8%)	0.39 (48.4%)
	ΔD →		± 0.0%	± 0.0%	± 0.0%	-5.3%	-10.5%	-18.4%	-26.3%	+10.5%	+21.0%	+15.8%	-13.1%	-15.8%
U = Nutzeffekt (%)		3.19	3.19	2.88	2.59	2.01	1.47	1.08	0.59	1.88	3.91	3.48	2.74	3.67
	ΔU →		± 0.0%	-9.7%	-18.8%	-37.0%	-53.9%	-66.1%	-81.5%	-41.1%	+22.6%	+9.1%	-14.1%	+15.0%

Abb. 22

stellung des Decarboxylierungsgleichgewichtes unter gleichzeitiger Messung des Sauerstoffverbrauches am Ende eines Versuchs nach vorheriger Zugabe von l-Propranolol, Orciprenalin und g-Strophanthin noch Na-Oktanoat zugegeben.

Es zeigte sich dabei sehr deutlich, daß durch Zugabe von 0,5 bis 2,0 mM Oktanoat die Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose von 0,34 auf 0,13 µMol/h·100 mg FG (- 61 %) nerabgesetzt wird. Der Sauerstoffverbrauch sinkt bei hohen Konzentrationen von Oktanoat, trotz stark negativ inotroper Wirkung nur von 2,68 auf 2,10 µMol pro Stunde und 100 mg FG (- 22 %) unter gleichzeitigem Frequenzabfall ab, so daß der Nutzeffekt beträchtlich abnimmt (von 6,53 % auf 1,75 %). Berechnet man aber den Anteil oxydierter, exogener Glucose am Gesamt-O_2-Verbrauch, so sinkt dieser unter Oktanoat (2,0 mM) von 76,9 % (Mp 11) bis auf 38,7 % (Mp15) ab (= - 50 %).

Interessant ist, daß die negativ inotrope Wirkung von Oktanoat durch g-Strophanthin aufgehoben werden kann, wobei aber der oxydierte Glucoseanteil weiter absinkt und der Nutzeffekt wieder leicht ansteigt. Dies zeigt sich auch im folgenden Versuch MK 51 (Abb. 22), bei dem Oktanoat bis zu einer Endkonzentration von 1,0 mM zugegeben, die positiv inotrope Wirkung von Strophanthin (Mp 9, 10, 11) inhibiert und wobei ohne Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs die Decarboxylierungsrate zurückgedrängt wird. Der Substratanteil oxydierter Glucose am Gesamt-O_2-Verbrauch sinkt von 70 % auf 48 % ab (Mp 13). Weitere Zugabe von Strophanthin hebt die negativ inotrope Wirkung von Oktanoat auf. Der negativ inotrope Effekt von Oktanoat dürfte damit auf einer Hemmung des Ca-Fluxes beruhen, der durch g-Strophanthin antagonistisch beeinflußt werden kann.

C. Kinetik der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Dekanoat:

1. Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von ^{14}C-Dekanoat an Herzvorhöfen mit normalem Glykogengehalt und Zusatz exogener Glucose:

a. Versuche mit 15 mM Glucose und absteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Decanoat am spontanschlagenden Herzvorhof: (Abb. 23,24)

Bei Inkubation mit 15 mM Glucose und absteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Dekanoat zeigen sich funktionelle Eigenheiten in verstärktem Maße, die auch bereits bei Oktanoat und Nonanoat angedeutet beobachtet wurden: Zusatz von 1,6 mM Na-Dekanoat führt trotz Inkubation mit 15 mM Glucose zu einer Senkung der Amplitude auf fast unmeßbare Werte unter zunehmender Rückstandskontraktur. Es bleiben aber deutliche rhythmische Zuckungen bestehen, welche eine erhöhte Frequenz um 150/min aufweisen. Die Decarboxylierungsrate stellt sich nach etwa zwei Stunden ein. Mit Abnahme der Konzentration zeigt sich erst bei 0,4 mM (Abb. 23) eine allmähliche Lösung der Kontraktur unter zunehmender Erhöhung der Kontraktionsamplitude und abnehmender Frequenz. Es erscheint daher verständlich, daß die Aufstellung einer Kinetik durch diese toxischen Einflüsse erschwert wird. Ein einziger Versuch (Os 94) zeigte nach Umrechnung auf eine Frequenz von 100/min eine Kinetik nach Lineweaver-Burk: Die Michaelis-Konstante beträgt 0,097 mM und V_{max} 0,125 µMol/h·100 mg FG, entsprechend einem maximalen Sauerstoffverbrauch von 1,75 µMol/h·100 mg FG, was einem sehr geringen Anteil von Dekanoat am Gesamt-O_2-Verbrauch entspricht.

Nimmt man aus vier Versuchen einen Mittelwert, so zeigt sich bei sehr großer Streubreite (Abb. 24), daß eine Linearität nach Lineweaver-Burk nur im Bereich zwischen 0,2 und 1,6 mM anzutreffen ist. Dies entspricht einem K_m von 0,16 mM und einem V_{max} von 0,12 µMol/h·100 mg FG, was einem O_2-Verbrauch von 1,68 µMol/h und 100 mg FG entspricht. Dieser Wert ist abnorm niedrig und würde bei 6,3 µMol/h·100 mg FG Gesamt-O_2-Verbrauch = 26,6 % Anteil oxydierten Dekanoats entsprechen. Bei niedrigerer Konzentration biegt die Gerade sehr deutlich ab; die Werte sind gegenüber denen der gemessenen Geraden zu hoch. Ein Wechsel der Kinetik ist sehr

Einwirkung von Dekanoat auf Kontraktionskraft und Frequenz des isolierten spontanschlagenden Meerschweinchenherzvorhofes

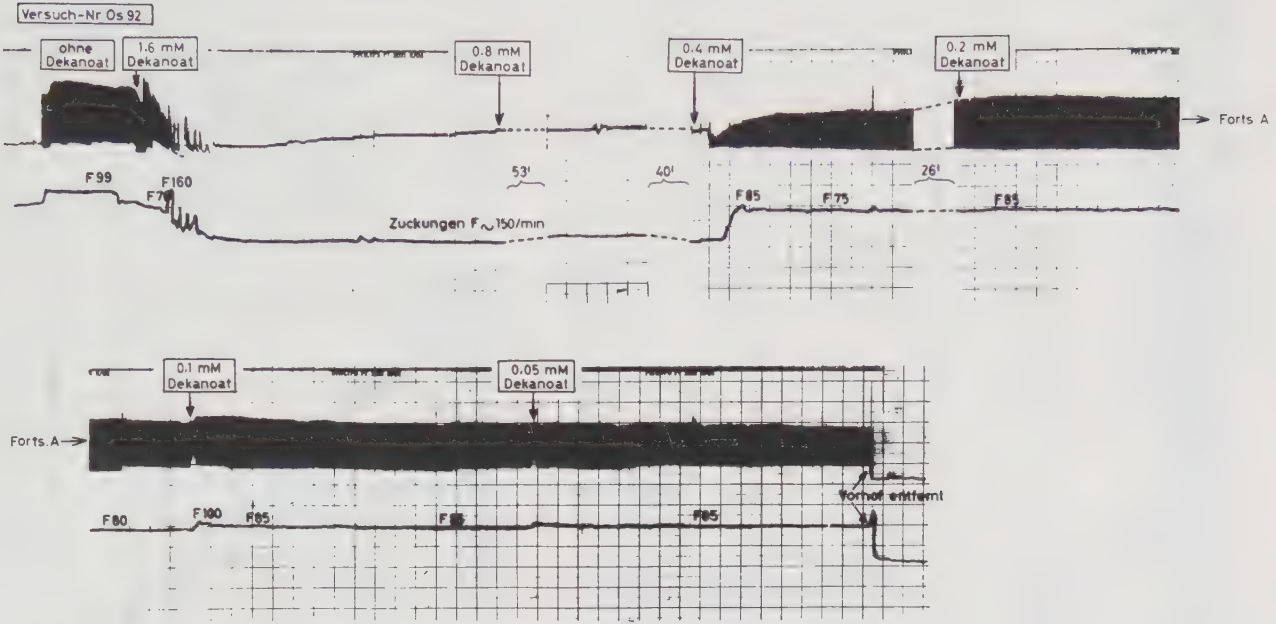


Abb. 23

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Dekanoat (spez. Akt. 1 µC/2.5 µMol) + 15 mM Glucose am spontanschlagenden Herzvorhof in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S)

(Mittelwerte aus 4 Versuchen)

Versuch-Nr. Os 92-95

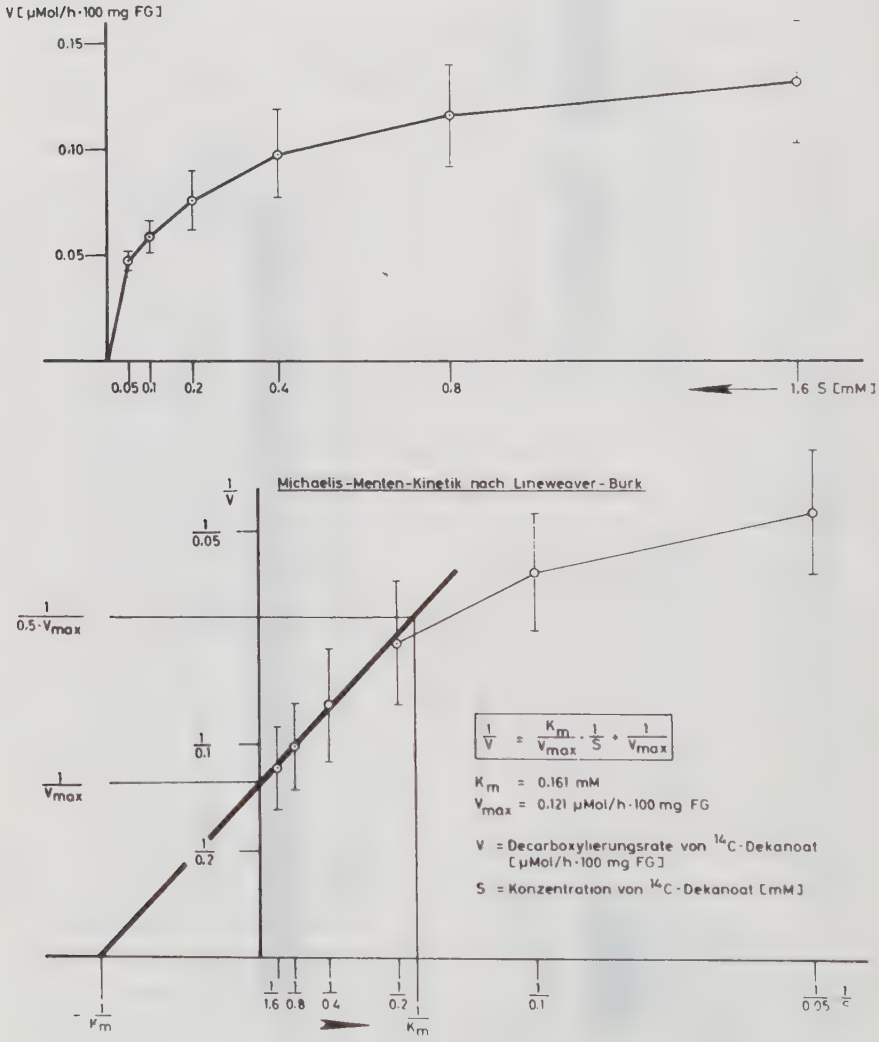


Abb. 24

deutlich zwischen 0,2 und 0,1 mM zu erkennen, so daß also hier die Verhältnisse wesentlich komplizierter liegen als bei den kürzerkettigen Substraten.

b. Versuche mit 15 mM Glucose und absteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Dekanoat am stillgestellten Herzvorhof: (Abb. 25)

An stillgestellten Herzvorhöfen bestehen ähnliche Verhältnisse. Auch hier erscheinen die Werte bei 1,6 mM relativ erhöht. Legt man zwischen 0,1 und 1,6 mM eine Gerade, so erhält man ein K_m von 0,29 mM bei einem V_{max} von 0,11 µMol/h·100 mg FG, das nur unwesentlich unterhalb der Werte des schlagenden Herzvorhofs liegt. Dekanoat zeigt sich damit als wesentlich schwächer stoffwechselaktiv als Oktanoat, während sich die mittlere Oxydationsrate bei 1,6 mM nicht wesentlich von der von Nonanoat und Oktanoat unterscheidet. Nur scheint hier auch die Streubreite der K_m-Werte erhöht, wie die beobachteten Grenzwerte von 0,097 und 0,28 mM zeigen.

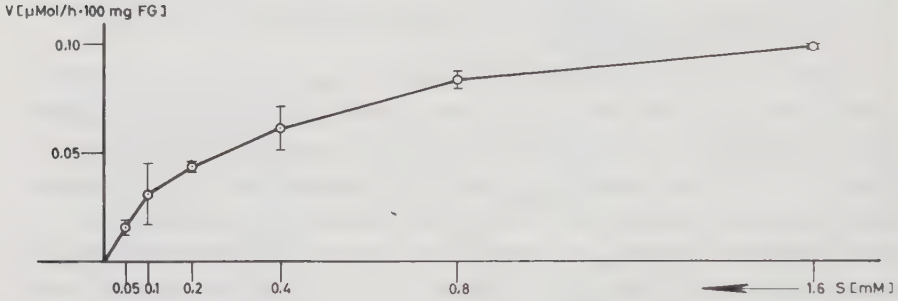
c. Versuche mit 5 mM Glucose und aufsteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Dekanoat am spontanschlagenden Herzvorhof: (Abb. 26)

Da die Kinetik als Folge des, bei auf- und absteigenden Konzentrationen, unterschiedlichen Glykogengehaltes verschiedene Werte ergibt, sollte in der folgenden Versuchsreihe mit aufsteigenden Konzentrationen von ^{14}C-Dekanoat bei Anwesenheit von 5 mM Glucose die Oxydationsrate untersucht werden. Es waren dabei bei niedrigen aufsteigenden Konzentrationen von Dekanoat und dem zu erwartenden hohen Anteil aus dem Glucosestoffwechsel relativ niedrigere Werte zu erwarten als bei den Befunden mit absteigenden Konzentrationen.

Auch hier zeigte sich bei 0,8 mM Dekanoat einsetzend eine Arrhythmie unter Frequenzanstieg. Bei 1,6 mM sank die Kontraktionsamplitude auf fast unmessbare Werte: In einem Versuch waren keine Zuckungen zu bemerken, in einem anderen eine Frequenz von 200/min. Wie aus Abbildung 25 hervorgeht, ist daher auch die Decarboxy -

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Dekanoat (spez. Akt. 1 µC/2,5 µMol) + 15 mM Glucose am stillgestellten Herzvorhof in Abhängigkeit von absteigenden Außenkonzentrationen (S) (Mittelwerte aus 3 Versuchen)

Versuch-Nr. 96 - 98



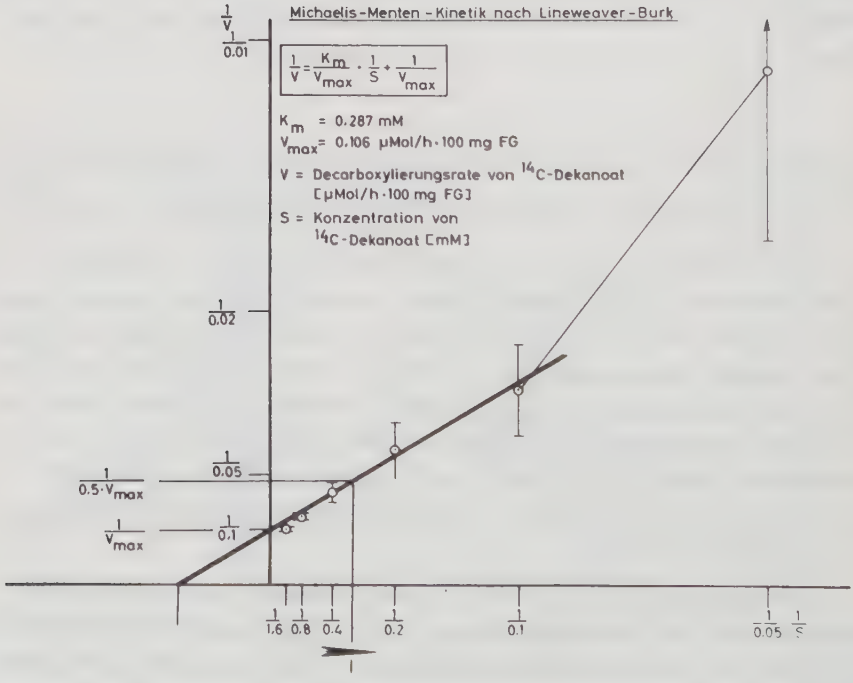
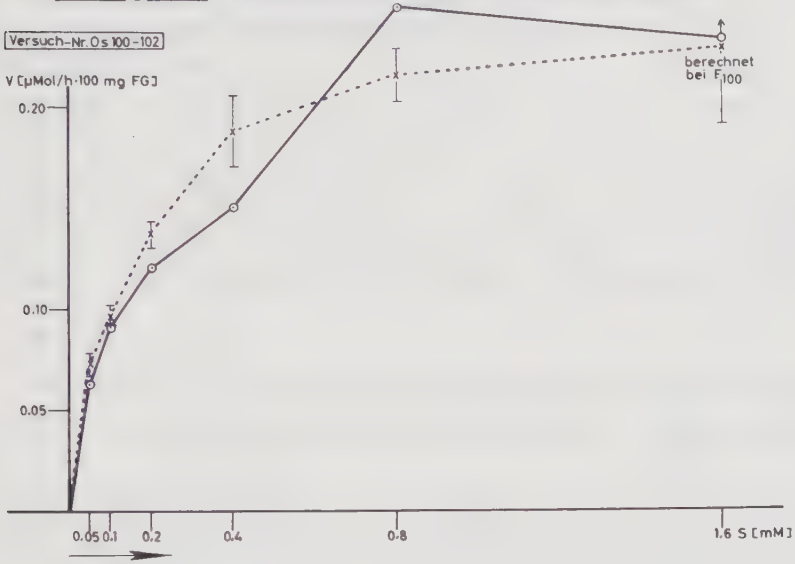


Abb. 25

Decarboxylierungsrate (V) von ^{14}C-Dekanoat (spez. Akt. 1 µC/2.5 µMol) + 5 mM Glucose am spontanschlagenden Herzvorhof in Abhängigkeit von aufsteigenden Außenkonzentrationen (S). (Mittelwerte aus 3 Versuchen)



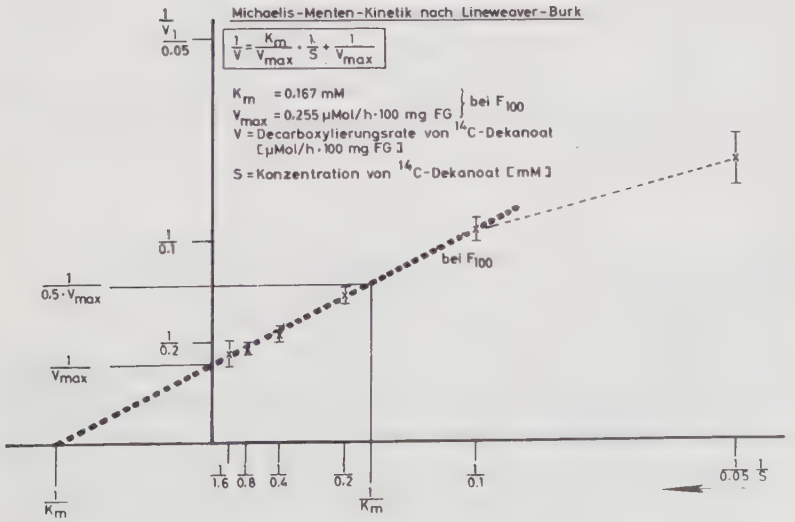


Abb. 26

lierungsrate ohne Umrechnung auf die Frequenz sehr von dieser Leistungsänderung abhängig. Nach Umrechnung ergibt sich aber zwischen 0,1 und 1,6 mM eine Gerade mit einem K_m von 0,167 mM und einem V_{max} von 0,255 µMol/h·100 mg FG, das mit einem Sauerstoffverbrauch von 3,57 µMol O_2/h·100 mg FG einem Substratanteil von etwa 60 % entspricht. Möglicherweise kommt dieser hohe Anteil dadurch zustande, daß die hohen toxischen Konzentrationen erst am Ende der Versuche gegeben wurden. Dafür spricht auch der höhere Substratumsatz bei 1,6 mM mit 0,27 µMol/h·100 mg FG gegenüber 0,13 µMol bei absteigenden Konzentrationen. Der K_m-Wert entspricht damit dem gefundenen Mittelwert bei absteigenden Konzentrationen.

d. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose durch Dekanoat am spontanschlagenden Herzvorhof: (Abb. 27)

Gibt man am spontanschlagenden Herzvorhof nach Einstellung des Decarboxylierungsgleichgewichtes nach Inkubation mit ^{14}C-Glucose aufsteigende Konzentrationen von Dekanoat, so zeigt sich übereinstimmend mit Zunahme der Dekanoat-Konzentration ein Abfall der ^{14}C-Glucose-Oxydation. Eine Konzentration von 1,6 mM Dekanoat führte in einem Versuch zum Stillstand. Der Abfall beträgt genau 50 % des Stoffwechsels, wobei die Frequenz in die Berechnung einbezogen wurde. Diese Hemmung liegt nur geringfügig unter den bei Oktanoat beobachteten Werten. Der K_i-Wert nach Dixon beträgt 0,36 mM.

e. Beinflussung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose durch Dekanoat am stillgestellten Herzvorhof: (Abb. 28)

Völlig überraschend waren die Befunde, die am stillgestellten Herzvorhof erhoben wurden. Nach KCl-Stillstand wurde das Decarboxylierungsgleichgewicht abgewartet. Zugabe von Dekanoat führte nach geringfügigem Abfall zwischen 0,05 und 0,1 mM in zwei Versuchen zu kontinuierlichem Anstieg der Decarboxylierungsrate und bei weiterer Zugabe von 0,8 mM Dekanoat zu einem Anstieg von 0,16 auf 0,26 µMol Glucose pro h und 100 mg FG (= +63 %).

Hemmung der Decarboxylierungsrate (V) von 15 mM ^{14}C-Glucose (spez. Akt. 1 µC/10 µMol) durch aufsteigende Konzentrationen (I) von Na-Dekanoat am spontanschlagenden Herzvorhof

Versuch-Nr Os 105.106

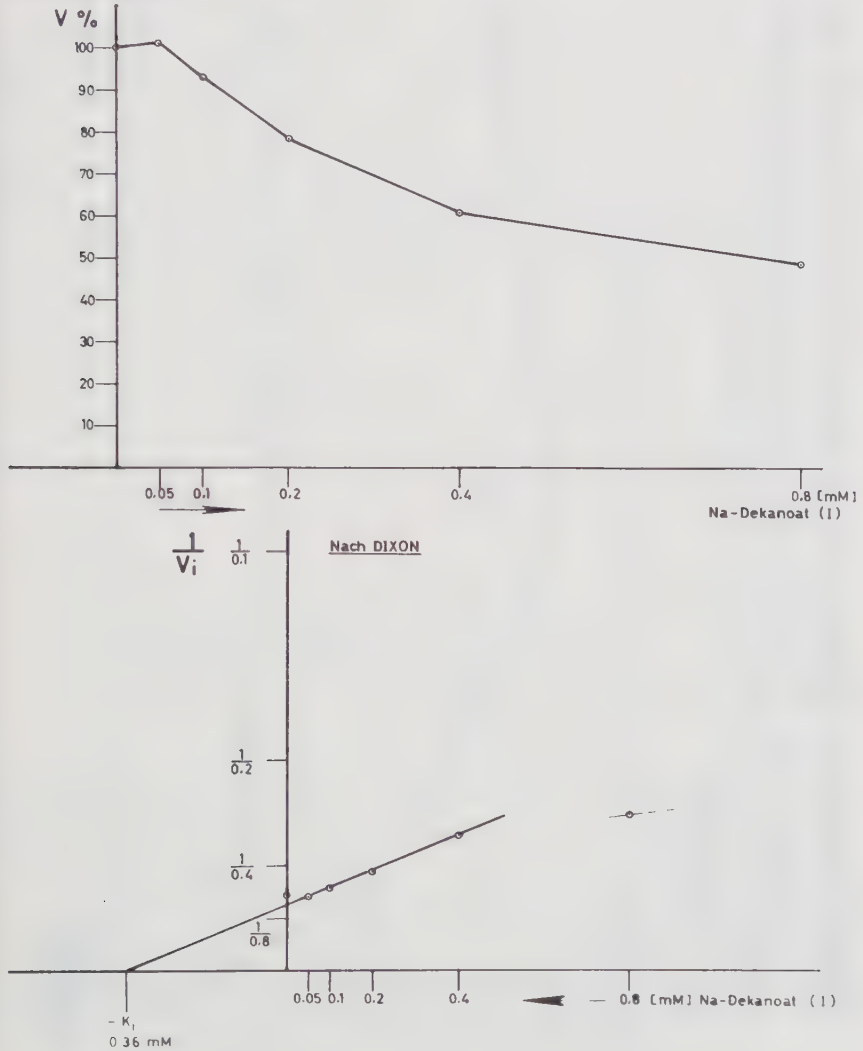


Abb. 27

Beeinflussung der Decarboxylierungsrate (V) mit 7.5 und 15 mM ^{14}C-Glucose (spez. Akt. 1 µC/10 µMol) durch aufsteigende Konzentrationen (S) von Na-Dekanoat am stillgestellten Herzvorhof

Versuch-Nr. Os 103.107.108
Os 104

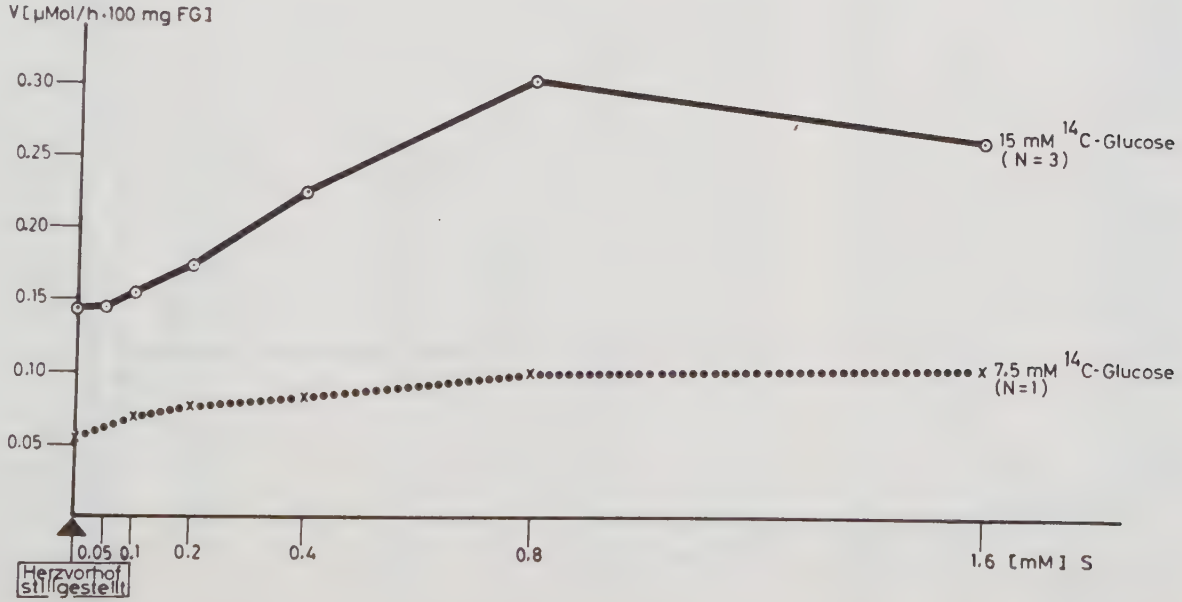


Abb. 28

Weitere Zugabe von Dekanoat senkte die Decarboxylierungsrate wieder geringfügig.

Auch bei Inkubation mit 7,5 mM ^{14}C-Glucose zeigte sich prinzipiell die gleiche Reaktion. Dieser Befund zeigt große Ähnlichkeit mit dem Wiederanstieg der Glucose-Oxydation nach hohen Konzentrationen von 3,2 mM Oktanoat. Eine Steigerung der Glucose-Oxydation am stillgestellten Herzvorhof ist aber doch überraschend, nachdem auch die Oxydations-Kinetik beim Vergleich zwischen spontanschlagenden und stillgestellten Herzvorhöfen zunächst vermuten liess, daß nach Stillstellung des Herzvorhofes die Fettsäuren bevorzugt verbrannt würden. Nachdem die Stoffwechselaktivität etwas geringer ist als bei Oktanoat, könnte es daher möglich sein, daß Oktanoat den Glykogenabbau hemmt und dadurch eine vermehrte Einschleusung von ^{14}C-Glucose verursacht, ohne selbst wesentlich an der Oxydation konkurrieren zu können.

Als zweite Möglichkeit käme eine Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung mit Erhöhung des Sauerstoffverbrauches bei der hohen Konzentration zwischen 0,8 und 1,6 mM in Frage.
Um dies zu klären, wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

f. Beeinflussung der Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Glucose durch Dekanoat am stillgestellten Herzvorhof bei gleichzeitiger Messung des Sauerstoffverbrauches: (Abb. 29 und 30)

In zwei völlig gleich verlaufenden Versuchen konnte bei gleichzeitiger Messung des O_2-Verbrauches gezeigt werden, daß nach KCl-Stillstand niedrige Konzentrationen von Dekanoat zunächst geringfügig die Oxydation von Glucose hemmen (Abb. 29), es dann aber zu einem raschen Anstieg der Glucose-Oxydation und des Sauerstoffverbrauches kommt. Mit Eintritt der Kontraktur geht auch der erhöhte Sauerstoffverbrauch wieder etwas zurück. Damit wäre der Nachweis eines echten entkoppelnden Effektes als toxische Wirkung der Fettsäure Dekanoat erbracht.

In diesem Versuch (Abb. 29) zeigt sich nun sehr deutlich, daß der Anteil exogener, oxydierter Glucose am Gesamt-Sauerstoffverbrauch von 89 % zwischen 0,1 mM Dekanoat und 0,2 mM Dekanoat

Sauerstoffverbrauch und Oxydation exogener ^{14}C-markierter Glucose und ihre Beeinflussung durch Dekanoat am stillgestellten Herzvorhof

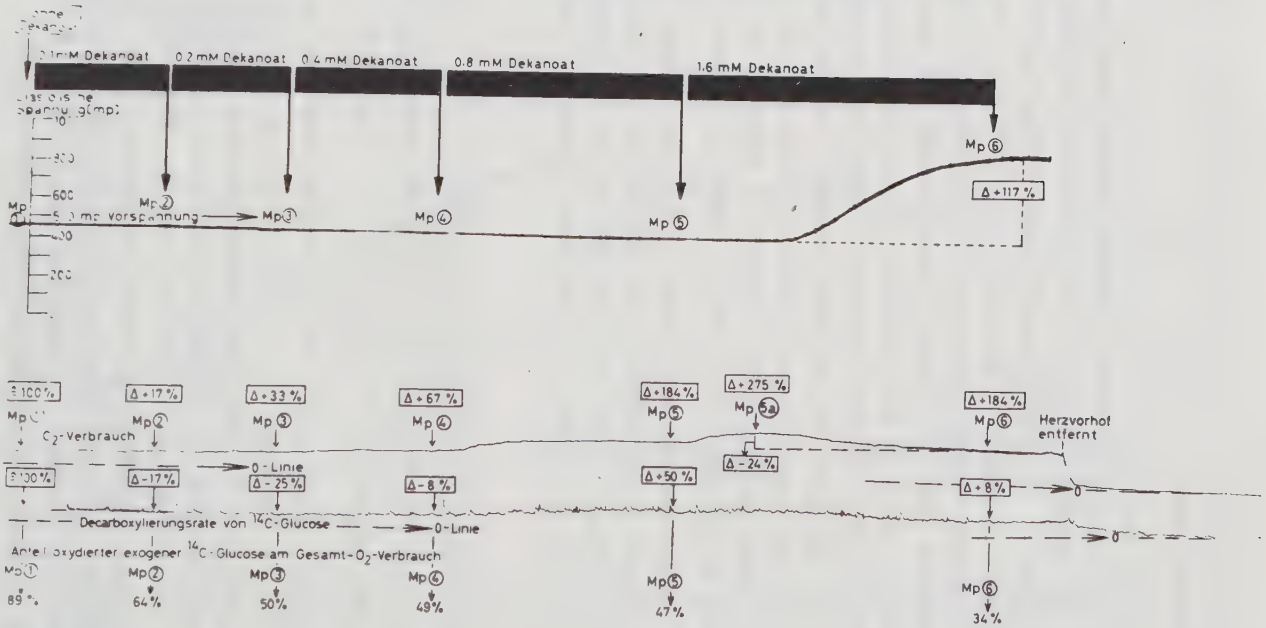


Abb. 29

O_2-Verbrauch und Oxydation von exogener ^{14}C-Glucose und ihre Beeinflussung durch Dekanoat am stillgestellten Herzvorhof

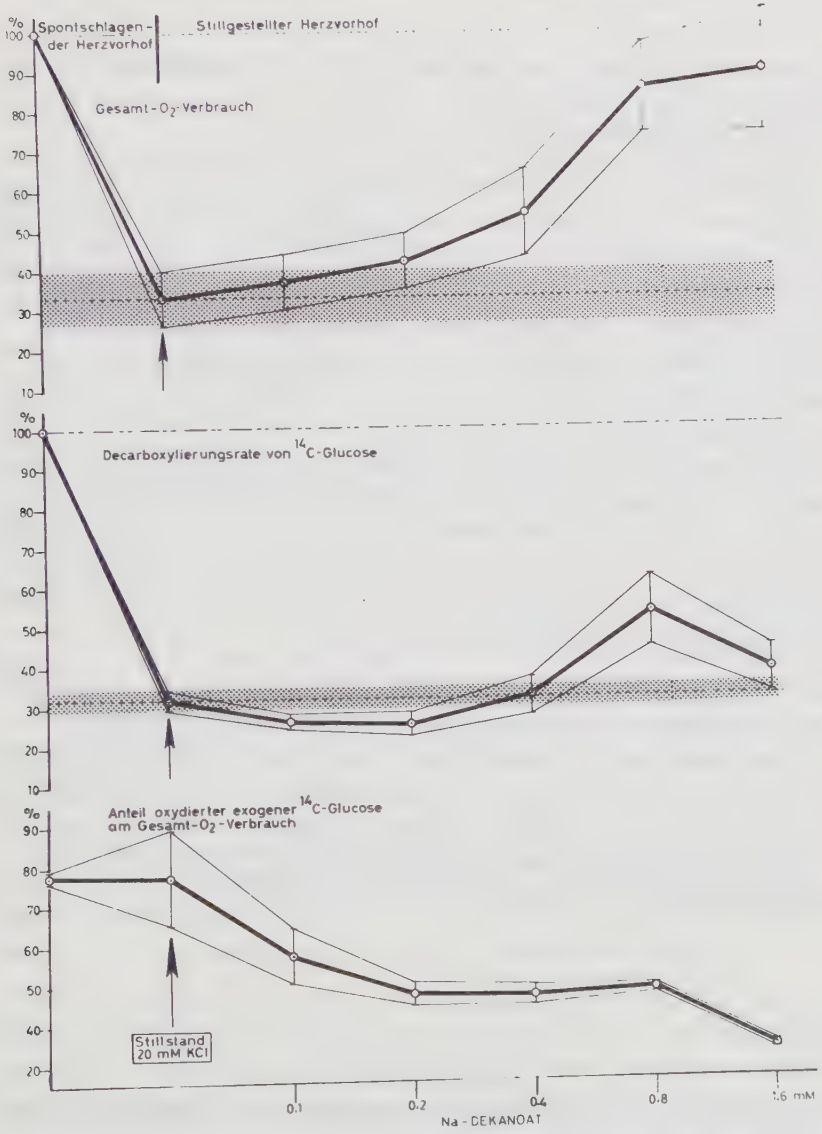


Abb. 30

sehr steil abfällt (auf 50 %), wobei der Sauerstoffverbrauch gegen - über dem Ausgangswert um 33 % zunimmt. Erst mit 0,8 mM und noch mehr mit 1,6 mM Dekanoat kommt es zu einem Anstieg des O_2-Ver - brauchs um fast das Doppelte des Ausgangswertes (Δ +184 %, bzw. Δ +275 %). Mit Beginn einer Kontraktur geht der Sauerstoffver - brauch wieder geringfügig zurück, wobei die ^{14}C-Glucose-Oxydation noch weiter zurückgedrängt wird.

Noch deutlicher wird dies in Abbildung 30 veranschaulicht, wo die Mittelwerte aus 2 gleichverlaufenden Versuchen dargestellt sind. Auch hier zeigt sich zuerst nach Stillstand ein Abfall von Sauerstoffverbrauch und Decarboxylierungsrate der ^{14}C-Glucose von 100 % auf etwa 32 %. Auch dies spricht bei einem Rest-Stoff - wechsel von etwa 30 % gegenüber den beobachteten 50 % bei Inku - bation mit Fettsäuren dafür, daß die letzteren bei Stillstand bevorzugt verbrannt werden. Der O_2-Anteil exogener, oxydierter Glu - cose bleibt dabei innerhalb eines größeren Streubereiches konstant. Gibt man nun ansteigende Konzentrationen von Na-Dekanoat, so fällt zwischen 0,1 und 0,2 mM der Anteil exogener, oxydierter ^{14}C-Glu - cose stark ab, wobei der Gesamt-O_2-Verbrauch mit zunehmender Kon - zentration der Fettsäure zunimmt. Hierbei nimmt, wenn auch wesent - lich schwächer, die Glucose-Oxydation zu.

Zunächst bleibt die Frage offen, ob dabei nun mehr Dekanoat oder mehr endogenes Glykogen oxydiert wird. Nachdem aber nach allen bisherigen Beobachtungen die Oxydation von Glykogen am still - gestellten Herzvorhof durch Fettsäuren gehemmt wird, erscheint es wesentlich wahrscheinlicher, daß die Fettsäuren vermehrt umge - setzt werden. Dafür sprechen auch die Befunde einer Steigerung der Hexanoat-Oxydation durch Zusatz von Oktanoat.

D. Beeinflussung von Leistung, Substrat-Oxydation und Nutzeffekt am spontanschlagenden, elektrisch stimulierten und still - gestellten Herzvorhof durch Hypothermie?

In einer gesonderten Versuchsreihe wurde geprüft, inwieweit Abkühlung von 37,5 bis auf 0 Grad Celcius die Leistung und die

Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Hexanoat und ^{14}C-Glucose beeinflußt.

1. Der spontanschlagende und stillgestellte Herzvorhof: (Abb. 31,32)

Sowohl bei Inkubation mit 2 mM Hexanoat (einer Konzentration, die einen oxydierten, exogenen Substratanteil am Gesamt-O_2-Ver - brauch von etwa 90 % erwarten läßt), wie auch mit 15 mM Glucose (50 %), zeigt sich übereinstimmend, daß Leistung und Frequenz zwischen 37,5 und 17,5° C, einer Temperatur, bei der die Spontan - rhythmik erlöscht, kontinuierlich abfallen. Dabei ist es interes - sant, daß sich die Kontraktionsarbeit pro Schlag (E_s) anders ver - hält als die Frequenz: Zunächst erfolgt ein Absinken der Arbeit zwischen 37,5 und 32,5° C, dann,nach einem weiteren Anstieg der Kontraktionsamplitude bei 25° C, ein erneuter Abfall bis 17,5° C, wo dann die Spontanrhythmik erlischt. Dabei kommt es aber noch immer zu einzelnen Spontanzuckungen, die Werte bis zu 150 % der Ausgangsamplitude erreichen können.

Die Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Hexanoat und ^{14}C-Glucose nimmt, wie zu erwarten, parallel zur Frequenz ab. Nach dem Still - stand bei 17,5° C sinkt der Stoffwechsel mit der Temperatur fast linear ab. Bei 0° C konnte bei Inkubation mit ^{14}C-Hexanoat kaum noch ein meßbarer Stoffwechsel (2 %) festgestellt werden, während bei Glucose immerhin noch etwa 6 % Ruhestoffwechsel des bei 37,5°C spontanschlagenden Herzvorhofes zu beobachten war.

Betrachtet man den Nutzeffekt, so fällt dieser sowohl bei Inkubation mit ^{14}C-Hexanoat wie auch mit ^{14}C-Glucose ab, wobei die Kurve nicht linear, sondern -besonders deutlich bei Hexanoat-Inkubation- mit einem Plateau bei 30° C verläuft.

Der durch KCl stillgestellte Herzvorhof zeigte bei tiefen Temperaturen keine Besonderheiten gegenüber dem durch Hypothermie stillgestellten Herzvorhof. Die Oxydationsrate beider Substrate sinkt entsprechend der niedrigeren Ausgangslage bei 37,5° C zuerst etwas steiler, dann fast linear ab und mündet bei 17,5° C trotz des KCl-Zusatzes in die nach Hypothermie-Stillstand gefundenen Werte ein. KCl-Zusatz erscheint demnach ohne wesentlichen Ein - fluß auf den Ruhestoffwechsel zu sein.

Beeinflussung von Leistung, Decarboxylierungsrate und Nutzeffekt am spontanschlagenden Herzvorhof bei Inkubation mit 15 mM ^{14}C-Glucose durch Hypothermie

Versuch-Nr. Os 66

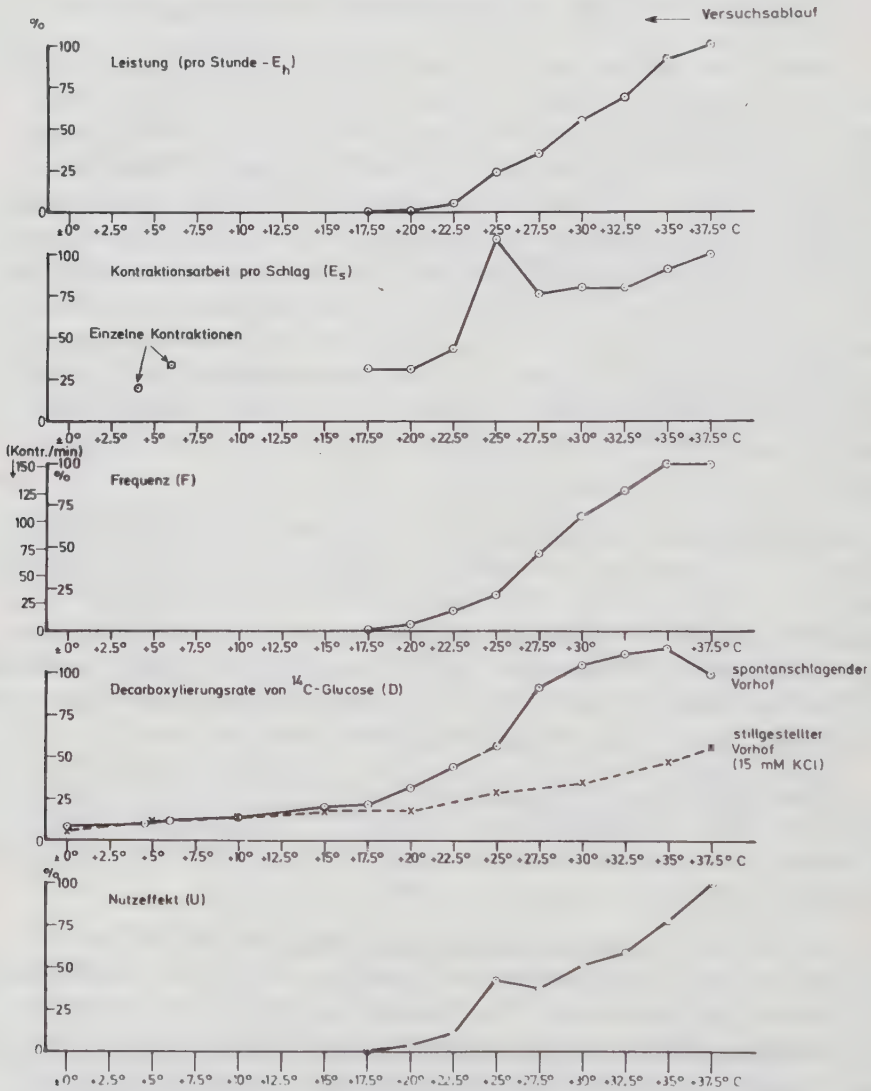


Abb. 31

Beeinflussung von Leistung, Decarboxylierungsrate und Nutzeffekt am spontanschlagenden Herzvorhof bei Inkubation mit 2 mM ^{14}C-Hexanoat + 5 mM Glucose durch Hypothermie

Versuch-Nr Os 64

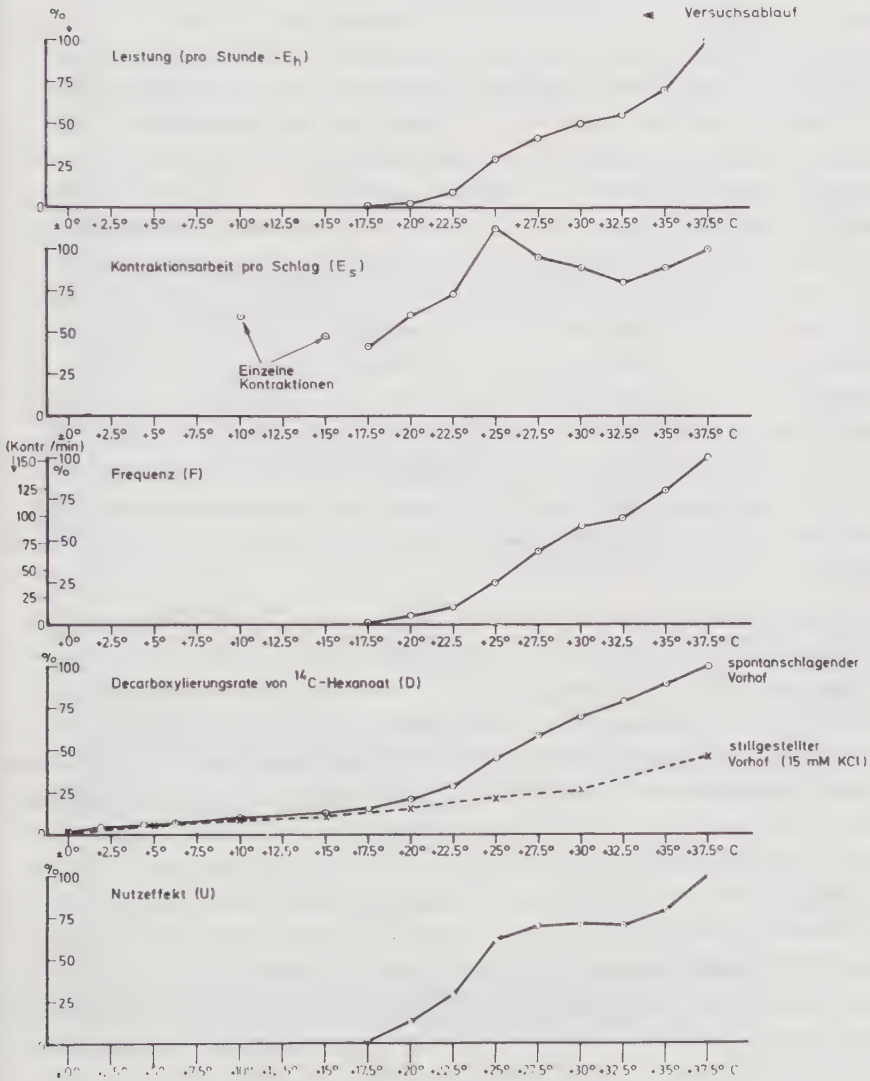


Abb. 32

2. Der elektrisch stimulierte Herzvorhof: (Abb. 33 und 34)

Bei elektrischer Reizung, mit der dem Herzvorhof eine Frequenz von 100/min aufgezwungen wurde, verhält sich nun der Nutzeffekt völlig anders als am spontanschlagenden Herzvorhof.

Reizt man den Herzvorhof mit der genannten Frequenz bei 37,5° C und senkt die Temperatur, so steigt die Kontraktionsamplitude im Unterschied zum spontanschlagenden Herzvorhof mit sinkender Temperatur kontinuierlich an. Da im Unterschied zum spontanschlagenden Herzvorhof bei elektrischer Stimulierung die Frequenz von der Hypothermie zunächst nicht beeinflußt wird und die Oxydationsrate geringfügig absinkt, kommt es bis zu 25° C zu einem fortlaufenden Anstieg des Nutzeffektes, d. h. mit anderen Worten: Vergleicht man Herzleistung und Nutzeffekt bei 37,5° C und 25° C, so findet sich eine Zunahme der Leistung durch positiv inotrope Wirkung bis zum vierfachen des Ausgangswertes. Da der Stoffwechsel nur geringfügig erniedrigt wird, ergibt sich eine beträchtliche Erhöhung des Nutzeffektes. Wichtig erscheint, daß nach Stillstellen des elektrisch stimulierten Herzvorhofes der Stoffwechsel höher ist als nach Stillstand eines spontanschlagenden Herzvorhofes. Dies zeigt besonders deutlich den Unterschied zwischen spontanschlagendem und elektrisch stimulierten Herzvorhof.

Wir untersuchten nun die Kontraktionsarbeit pro Schlag (E_s) und die Frequenz mit und ohne elektrischer Reizung an demselben Herzvorhof (Abb. 34). Versucht man bei der jeweiligen Temperatur durch elektrische Stimulierung dem Vorhof eine maximale Frequenz aufzuzwingen, so zeigt sich für die Frequenz eine Linksverschiebung: Auch unter dem Grenzwert von 17,5° C, bei dem die Spontanrhythmik erlischt, ist es möglich durch elektrische Stimulierung bei 10° C und sogar noch bei 6° C, dem Herzvorhof einen Rhythmus mit etwa 8 Schlägen pro Minute (6° C) aufzuzwingen. Dabei ist auch eine Kontraktionsamplitude von fast 50 % ! des Ausgangswertes zu beobachten. Die Kontraktionsamplitude pro Schlag kann im Unterschied zur Frequenz bis zur Temperatur von 17,5° C durch elektrische Stimulierung noch gesteigert werden, erst dann fällt sie zwischen 17,5 und 4° C steil ab.

Beeinflussung von Leistung, Decarboxylierungsrate und Nutzeffekt am spontanschlagenden bzw. elektrisch gereizten Herzvorhof bei Inkubation mit 2 mM ^{14}C-Hexanoat + 5 mM Glucose durch Hypothermie

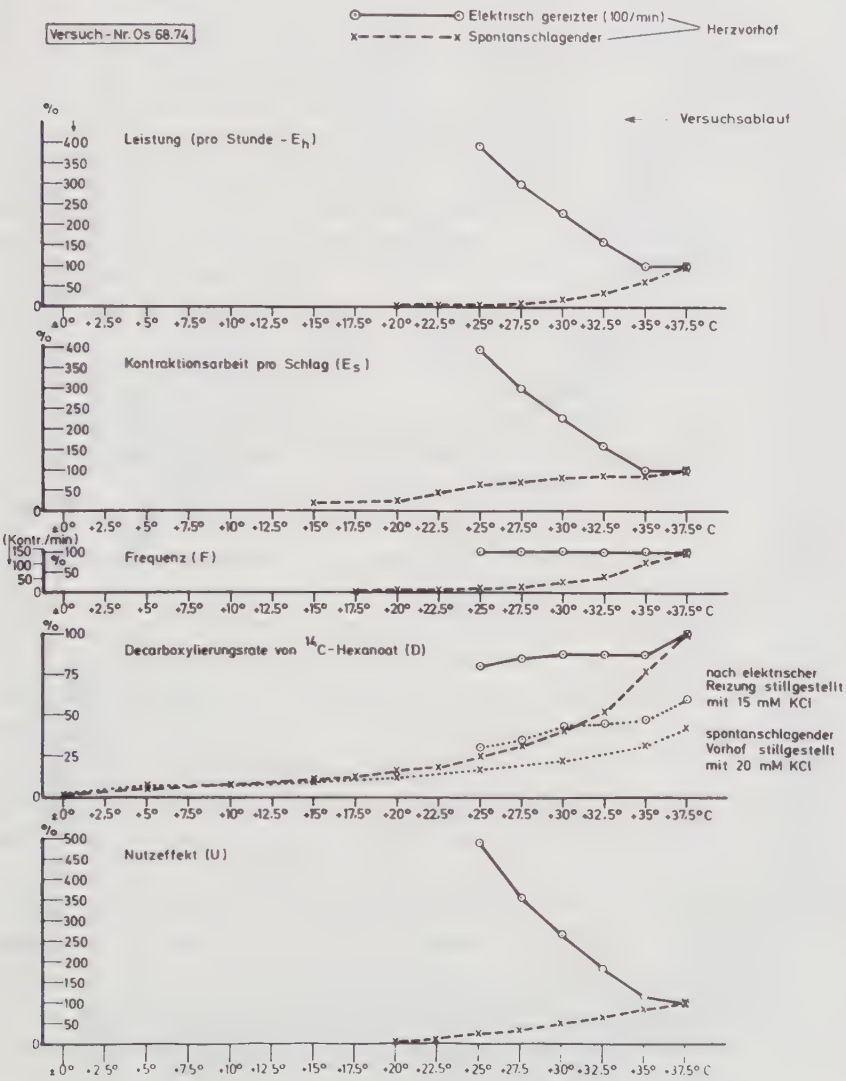
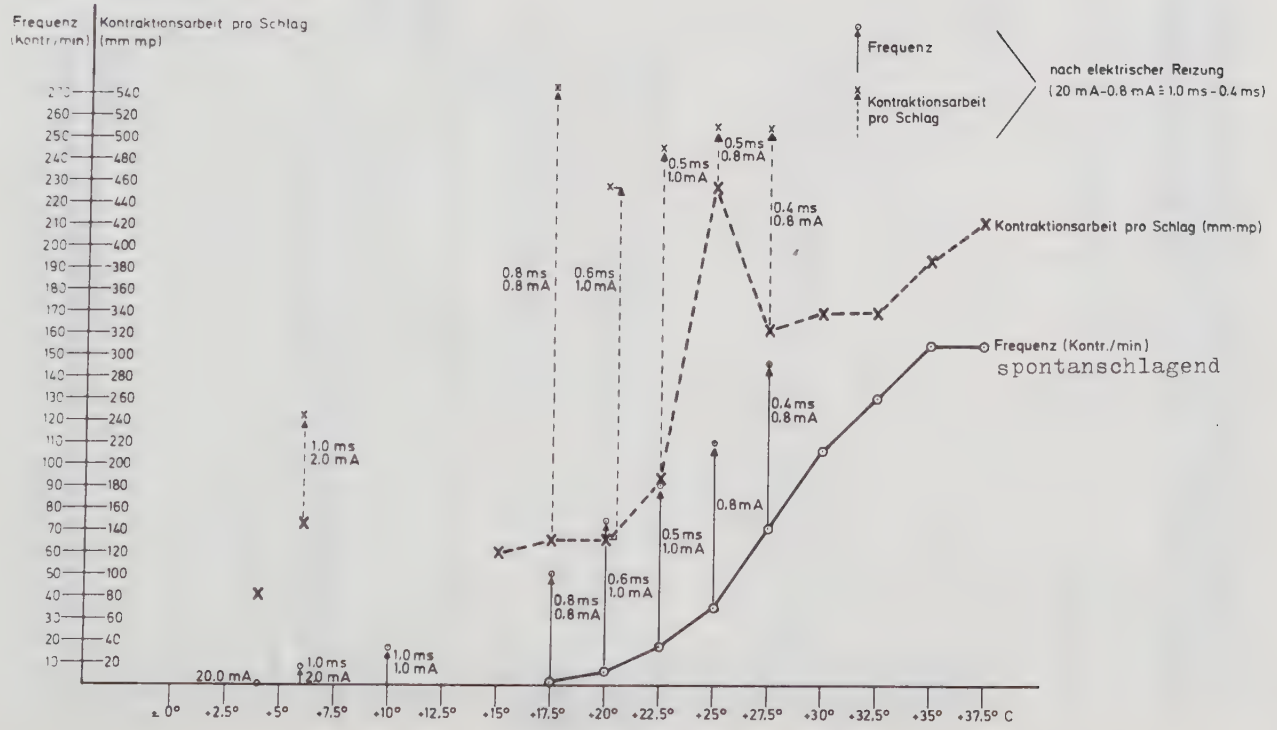


Abb. 33

Abb. 34

Beeinflussung von Kontraktionsarbeit pro Schlag und Frequenz am spontan-schlagenden bzw. elektrisch gereizten Herzvorhof durch Hypothermie

Versuch-Nr Os 68



V. D I S K U S S I O N :

Die durchgeführten Versuche zeigen, daß, ähnlich wie es bereits von SCHNEIDER (1970), SIESS, KELLER et al. (1970) und BARTOS (1970) für Glucose, Lactat, Pyruvat, Hexanoat und Nonanoat gezeigt werden konnte, auch die Oxydationsrate der exogenen Fettsäuren Oktanoat und Dekanoat mit zunehmender Außen-Konzentration ansteigt. Da bei niedrigen Konzentrationen der C_6 - C_8-Fettsäuren der Sauerstoffverbrauch nicht nennenswert verändert wird, ist diese Zunahme der Oxydationsrate der genannten exogenen Fettsäuren in Abhängigkeit von der Außenkonzentration nur so zu erklären, daß die Oxydation endogener Substrate aus dem Kohlenhydratstoffwechsel und möglicherweise auch aus den geringen Triglyceridmengen im Herzvorhof zunehmend gehemmt wird. Diese Konkurrenz zwischen exogenen und endogenen Substraten in der Oxydation ist aber nun von mehreren Faktoren abhängig:(Abb. 35): Einmal von der Durchtrittsgeschwindigkeit durch die Zellmembran und zum anderen von dem Eintritt in den Stoffwechsel, wobei hier das Coenzym A das Schlüsselenzym sein dürfte. Während für Glucose bereits beim Durchtritt durch die Zellmembran auf Grund der hohen Michaelis-Konstanten ein besonderer Carrier-Mechanismus angenommen werden muß, diffundieren die freien Fettsäuren auf Grund ihres festgestellten niedrigen K_m-Wertes offensichtlich sehr viel leichter durch die Zellmembran. Ob dieser transmembrane Transport dadurch erfolgt, daß die Fettsäuren in nicht-dissoziierter, lipidlöslicher Form durch die Zellmembran diffundieren, oder ob sie -eventuell mit Carnitin verestert- permeieren, wie es von KLINGENBERG und BODE (1965) für die Mitochondrien-Membran angenommen wird, können wir nach unseren Befunden nicht entscheiden. Es zeigt sich aber deutlich (Abb. 36), daß die Michaelis-Konstante mit Zunahme der C-Atome der Fettsäuren abnimmt, so daß also ein leichteres Eindringen besonders von Hexanoat nach Oktanoat zu beobachten ist (K_m von 0,46 bis 0,58 mM bis 0,15 - 0,18 mM). Der Sprung von Oktanoat nach Dekanoat (0,16 mM) ist nicht mehr so groß; denn die Michaelis-Konstante dieser Fettsäure liegt im Streubereich derjenigen von Oktanoat.

Betrachtet man nun die V_{max}-Werte (Abb. 36 A und B), so ist sehr aufschlußreich, daß offensichtlich Hexanoat auf Grund seiner hohen Oxydations-Aktivität sehr viel stärker Metabolite aus dem Kohlenhydratstoffwechsel verdrängen kann als Oktanoat und Dekanoat.

Schema des Glucose- und Fettsäureabbaues

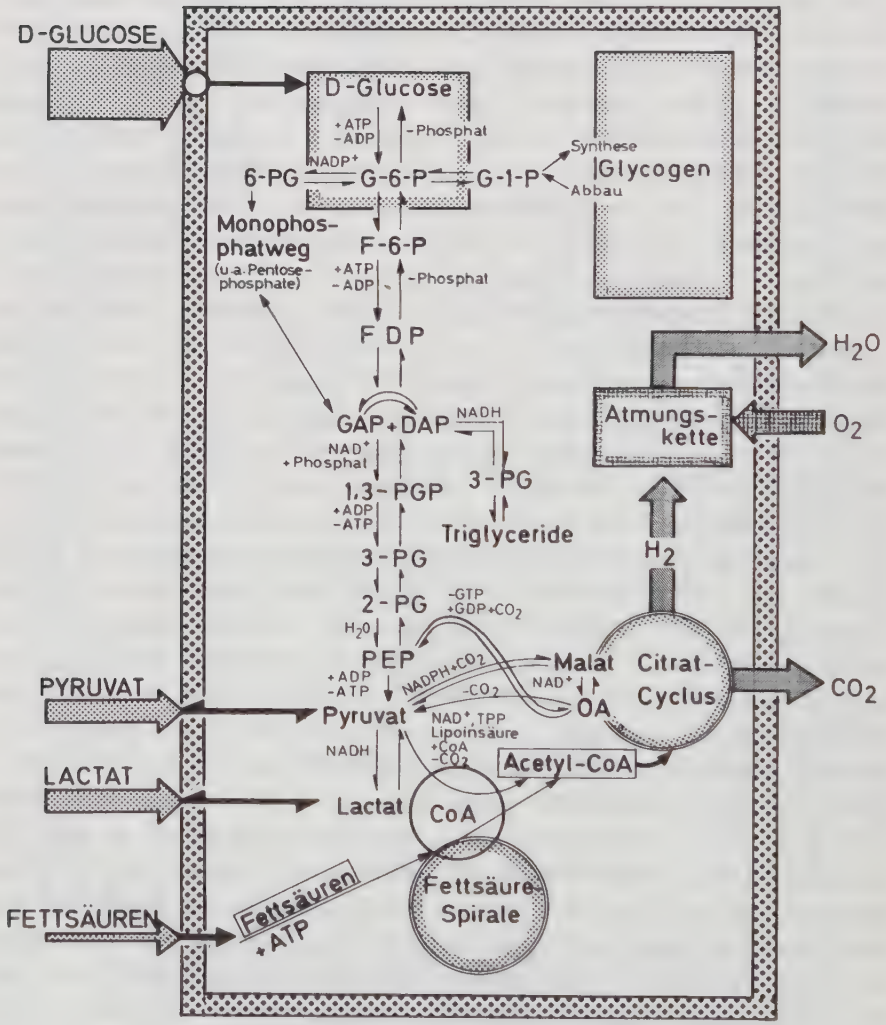


Abb. 35

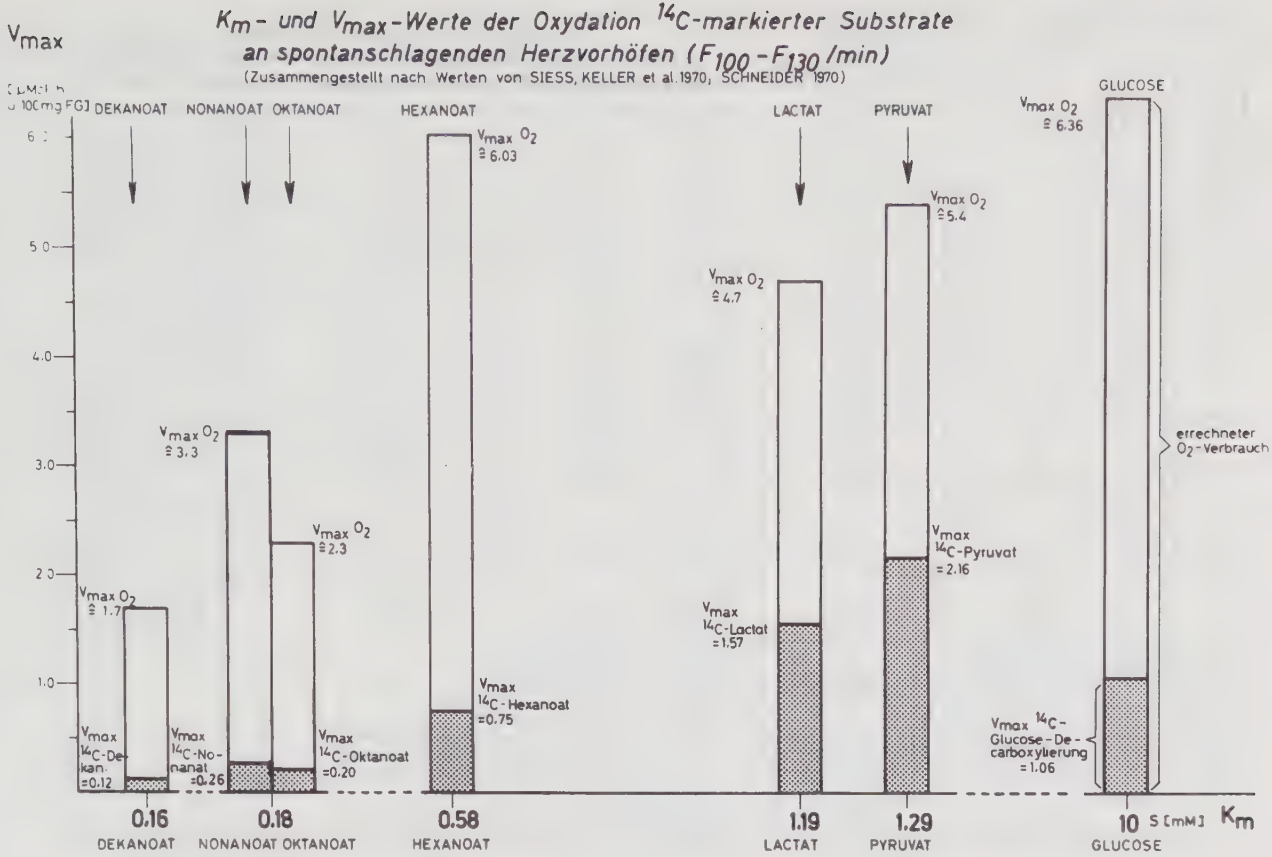

K_m - und V_{max}-Werte der Oxydation ^{14}C-markierter Substrate
an spontanschlagenden Herzvorhöfen (F_{100} - F_{130} /min)
(Zusammengestellt nach Werten von SIESS, KELLER et al. 1970; SCHNEIDER 1970)
V_{max}
DEKANOAT
NONANOAT
OKTANOAT
HEXANOAT
LACTAT
PYRUVAT
GLUCOSE
V_{max} O_2 ≙ 1.7
V_{max} O_2 ≙ 3.3
V_{max} O_2 ≙ 2.3
V_{max} O_2 ≙ 6.03
V_{max} O_2 ≙ 4.7
V_{max} O_2 ≙ 5.4
V_{max} O_2 ≙ 6.36
V_{max} ^{14}C-Dekan. =0.12
V_{max} ^{14}C-Nonanat =0.26
V_{max} ^{14}C-Oktanoat =0.20
V_{max} ^{14}C-Hexanoat =0.75
V_{max} ^{14}C-Lactat =1.57
V_{max} ^{14}C-Pyruvat =2.16
V_{max} ^{14}C-Glucose-Decarboxylierung =1.06
errechneter O_2-Verbrauch
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.16
DEKANOAT
0.18
NONANOAT OKTANOAT
0.58
HEXANOAT
1.19
LACTAT
1.29
PYRUVAT
10
GLUCOSE
S [mM]
K_m

Abb. 36 A

Kinetik der Oxydationsrate exogener ^{14}C-markierter Substrate im isolierten Meerschweinchenherzvorhof

(Zusammengestellt nach Werten von SIESS, KELLER et al. 1970, SCHNEIDER 1970)

	Spontanschlagender Herzvorhof			Stillgestellter Herzvorhof (20 mM KCl)		
	K_m (mM)	V_{max} (µMol/h·100 mg FG) Decarboxylierungsrate	O_2-Verbrauch	K_m (mM)	V_{max} (µMol/h·100 mg FG) Decarboxylierungsrate	O_2-Verbrauch
^{14}C-Glucose (1 - 15 mM)	10.00^{xx}	1.06^{xx}	6.4	10.00^{xx}	0.54^{xx}	3.2
^{14}C-Na-Pyruvat (0.1-30 mM)	I 1.29^{x}	2.16^{x}	5.4	3.71^{x}	1.11^{x}	2.8
^{14}C-Na-Lactat (0.05-30 mM)	I 1.19^{x} II 0.84^{x} III 0.60^{xx}	1.57^{x} 1.54^{x} 1.57^{xx}	4.7 4.6 4.7	1.42^{x} — —	0.97^{x} — —	2.9 — —
^{14}C-Na-Hexanoat (0.1-4 mM)	0.46^{xx} ↯ 0.58	1.10^{xx} ↯ 0.75	8.8 ↯ 6.0	0.41^{xx} —	0.42^{xx} —	3.4 —
^{14}C-Na-Oktanoat (0.05-1.6 mM) (0.2 -1.6 mM)	0.18 ↯ 0.30	0.22 ↯ 0.20	2.3 ↯ 2.2	0.13 —	0.19 —	2.0 —
^{14}C-Na-Nonanoat (0.05-0.5 mM)	0.18^{xx}	0.26^{xx}	3.3	—	—	—
^{14}C-Na-Dekanoat (0.1-1.6 mM)	0.16	0.12	1.7	0.29	0.11	1.5

^{x} = Werte bestimmt bei abnehmenden Substratkonzentrationen
^{xx} = Werte bestimmt bei aufsteigenden Substratkonzentrationen
↯ = elektrisch stimuliert bei Frequenz 100/min

I = 1.25 - 15 mM
II = 0.156 - 15 mM
III = 0.156 - 15 mM optimale Kontraktionsleistung

Abb. 36 B

Dies geht besonders deutlich aus einem Vergleich der V_{max}-O_2-Werte hervor. Während bei Hexanoat bereits am nicht-glykogenverarmten Herzvorhof V_{max}-O_2-Werte erreicht werden, die -ähnlich wie bei Glucose- kaum noch einen Anteil endogenen Substrates am Gesamt-Sauerstoffverbrauch erwarten lassen, zeigt sich für Oktanoat ein weit geringerer Wert, der beim schlagenden Herzvorhof nur etwa 40 - 50 % Oxydationsanteil der Fettsäure erwarten läßt.

Verarmt man die Herzvorhöfe an Glykogen durch vorhergehende stundenlange Behandlung mit Orciprenalin, so zeigt sich in der Tat eine Erhöhung der V_{max}-Werte um ein Drittel, während die Michaelis-Konstante praktisch unverändert bleibt; ein Zeichen, daß der Durchtrittmechanismus offensichtlich viel weniger vom Glykogen - gehalt abhängt als von der Konkurrenz beim Eintritt in den Oxy - dationszyklus.

In Abbildung 37 sind die K_m- und die V_{max}-Werte von ^{14}C-Okta - noat bei verschiedener Behandlung der Herzvorhöfe zusammengestellt. Es zeigt sich dabei sehr deutlich, daß im Unterschied zu den Michaelis-Konstanten, die nur bei Orciprenalin-stimulierten Herzvor - höfen etwas niedrigere Werte aufweisen, der V_{max}-Wert bei glykogenreichen Herzvorhöfen um fast ein Drittel niedriger ist als an glykogenverarmten ohne Glucosezusatz in der Nährlösung. Daß V_{max} aber außer der Konkurrenz aus dem Kohlenhydratstoffwechsel auch von der Leistung abhängig ist, zeigt die weitere Erhöhung der V_{max}-Werte bei Stimulierung mit Orciprenalin. Inwieweit die etwas niedrige Michaelis-Konstante auf einen leichteren Eintritt bei einer Frequenzsteigerung hindeutet, kann bei dieser Streubreite nicht sicher gesagt werden.

Außerdem geht aus der Abbildung 36 hervor, daß Substrate mit hoher Stoffwechsel-Aktivität wie Hexanoat, Pyruvat, Lactat und auch Glucose am stillgestellten Herzvorhof ein V_{max} zeigen, das ungefähr die Hälfte des Wertes vom schlagenden Herzvorhof beträgt. Im Unterschied dazu zeigen Oktanoat und Dekanoat in stillgestell - ten, glykogenreichen Herzvorhöfen ein V_{max}, das nur geringfügig niedriger liegt als das schlagender Herzvorhöfe. Dies spricht dafür, daß im ruhenden Herzmuskel möglicherweise diese Fettsäuren den Glykogenabbau stärken hemmen, und bevorzugt verbrannt werden. Am glykogenverarmten Herzvorhof weist nämlich V_{max} nach Stillstnd

Abb. 37

V_{max} und K_m bei Inkubation mit ^{14}C-Oktanoat in Abhängigkeit vom Kohlenhydratstoffwechsel und Herzleistung

Herzvorhöfe	F	spontanschlagend K_m (mM)	spontanschlagend V_{max} (µmol/100 mg FG)	F	stillgestellt K_m (mM)	stillgestellt V_{max} (µMol/100 mg FG)
Glykogen-reich +15 mM Glucose	100	0,18	0,22	100	—	—
Glykogen-reich + 5 mM Glucose	100	0,18	0,21	100	0,13	0,19
Glykogen-arm ohne Glucose	100	0,16	0,29	100	0,18	0,18
Glykogen-arm ohne Glucose +Orciprenalin	200	0,12	0,38	200	—	—

den gleichen Wert wie am glykogenreichen auf, während V_{max} am schlagenden, glykogenverarmten Herzvorhof rund 40 % höher ist. Dies zeigt deutlich, daß am schlagenden, glykogenverarmten Herzvorhof die Fettsäuren als Substrat das fehlende Kohlenhydrat ersetzen müssen, während am glykogenreichen Herzvorhof bei Kontraktionsleistung das aus dem Glykogen bzw. exogener Glucose stammende Pyruvat die C_8 - C_{10} - Fettsäuren verdrängt, vermutlich auf Grund ihrer geringeren Affinität zum Coenzym A. Auch bei Dekanoat zeigt sich die mangelnde Stoffwechselaktivität dieser Substanz bei einem K_m von 0,16 mM und einem V_{max} von 0,26 µMol/h und 100 mg FG gegenüber Hexanoat sehr deutlich.

Sowohl mit Hexanoat wie mit Oktanoat kann man am schlagenden wie am stillgestellten Herzvorhof ohne wesentliche Änderung des Gesamt-O_2-Verbrauchs die Glucose-Oxydation mit Oktanoat um etwa 60 % unterdrückt werden. Während bei der Hemmung der Glucose-Oxydation durch Hexanoat sich noch ein echter kompetitiver Mechanismus nachweisen läßt, wirkt Oktanoat nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich partiell kompetitiv. Die Hemm-Konstante K_i beträgt für Hexanoat wie für Oktanoat ca 0,4 mM.

Interessant ist nun, daß die Decarboxylierungsrate von ^{14}C-Oktanoat durch Zusatz von Hexanoat ebenfalls partiell kompetitiv gehemmt werden kann. Ähnliches wurde auch von SCHNEIDER (1970), SIESS, KELLER et al. (1970) festgestellt, die zeigen konnten, daß die Oxydation von Pyruvat und Lactat durch Hexanoat partiell kompetitiv gehemmt werden kann. Da Hexanoat auf Grund seiner Michaelis-Konstante langsamer in die Zelle diffundiert als Oktanoat, muß es also, da es rascher oxydiert wird, eine größere Affinität zu Coenzym A besitzen als Oktanoat.

Ein reiner Verdünnungseffekt bei der Hemmung der Oktanoat-Oxydation durch Hexanoat liegt schon auf Grund der Kinetik nicht vor, denn aus den Untersuchungen geht hervor, daß die Hemmung der Decarboxylierungsrate von Oktanoat durch Hexanoat durch mehrere Vorgänge beeinflußt wird, wobei einmal eine Rolle spielen dürfte, daß Hexanoat wohl etwas schwerer durch die Zelle diffundiert, dagegen dort rascher umgesetzt wird als Oktanoat; zum andern, daß sowohl Oktanoat wie auch Hexanoat mit Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels am Coenzym A konkurrieren. Daher dürfte es verständlich sein, daß bei hohen Konzentrationen (0,8 und 1,6 mM Oktanoat

und 1,5 und 2,0 mM Hexanoat) möglicherweise ein kompetitiver Mechanismus (Abb. 18) dadurch besteht, daß hier die Konkurrenz aus dem Kohlenhydratstoffwechsel völlig zurückgedrängt ist. Es könnte aber auch ein kompetitiver Hemmungsmechanismus beim Transport durch die Zellmembran bestehen. Für die niedrigeren Konzentrationen würde dann eine durch die dritte Komponente an der Oxydation aus dem Kohlenhydratstoffwechsel bedingte Verzerrung der Hemmungsvorgänge zu den beobachteten Werten führen.

Umgekehrt verstärkt nun interessanterweise Zusatz von Oktanoat die Decarboxylierungsrate von Hexanoat. Ob dies durch einen Entkoppelungsmechanismus, der bei hohen Konzentrationen möglich erscheint, zustande kommt, oder durch eine Hemmung des Glykogenabbaues, kann zunächst nicht entschieden werden. Das erstere ist aber wahrscheinlicher.

Noch komplexer sind die Verhältnisse bei Dekanoat. Überraschenderweise zeigte sich, daß die Oxydation von ^{14}C-Glucose durch Zusatz inaktiven Dekanoats nur am schlagenden Herzvorhof um 50 % gesenkt wird. Am stillgestellten Herzvorhof zeigt sich dagegen eine beträchtliche Zunahme der Oxydation von Glucose. Dies könnte damit erklärt werden, daß Dekanoat im Herzvorhof den Glykogenabbau hemmt. Wenn dadurch der aus dem Glykogen stammende Anteil nicht-markierten Pyruvats zugunsten exogener ^{14}C-markierter Glucose-Metaboliten zurückgedrängt wird, könnte die Steigerung der ^{14}C-Produktion aus Glucose erklärt werden. Wie aber die Befunde bei gleichzeitiger Bestimmung des Sauerstoffverbrauches zeigen, kommt es wahrscheinlich als Folge einer Entkoppelung zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs , wobei es als weitere Folge zu einer Kontraktur kommt. Zweifellos zeigt damit die höherkettige C_{10}-Fettsäure, aber auch bereits angedeutet, die C_6 - C_8 - Fettsäuren in höheren Konzentrationen eine toxische Wirkung mit Entkoppelung in der Atmungskette, die sich auch funktionell auswirkt: Bereits bei Inkubation mit Hexanoat (SIESS, KELLER et al. 1970) kommt es zu einem Absinken des Nutzeffektes, und vor allem bei Frequenzsteigerung zu einer leichten Rückstandskontraktur. Dies haben wir nun bei Oktanoat und Dekanoat in verstärktem Maße beobachtet, wo bereits Konzentrationen von 1,6 mM Dekanoat zur Stillstands- und Rückstandskontraktur führen, wenn nicht die Oxydation der Fettsäure durch Glucoseanwesenheit zurückgedrängt wird.

Diese Rückstandskontraktur ist aber reversibel und Konzentrationen von 0,8 mM Oktanoat und 0,4 mM Dekanoat sind die Grenzkonzentrationen, bei denen die Funktionstätigkeit des spontanschlagenden Herzvorhofes bei einer Frequenz von 100/min nicht beeinträchtigt wird (Abb. 23). Daß diese negativ inotrope Wirkung, wie bei Oktanoat beobachtet, durch g-Strophanthin voll aufhebbar ist, deutet darauf hin, daß durch die Fettsäuren möglicherweise der Calzium-Transport in der Zelle behindert wird. Interessant ist, daß dabei der Nutzeffekt durch Strophanthin nur teilweise wieder verbessert werden kann.

Es ergibt sich aus den Untersuchungen, daß die C_8 bis C_{10}-Fettsäuren wohl leichter in die Zelle eindringen, aber auf Grund ihrer geringeren Affinität zum oxydativen Stoffwechsel geringer umgesetzt werden und dadurch durch Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels (Pyruvat und Lactat) zurückgedrängt werden können. Dies erfolgt offensichtlich dann, wenn diese Kohlenhydrat-Metaboliten bei verstärkter Kontraktionsleistung, sei es durch elektrische Stimulierung, sei es durch Adrenergica, vermehrt anfallen.

Damit könnte man erklären, daß am stillgestellten Herzvorhof wiederum vermehrt Fettsäuren oxydiert werden. Mit zunehmender Zahl der C-Atome der Fettsäuren nimmt offensichtlich der absolute Sauerstoffverbrauch auch im Ruhestoffwechsel zu; bei Arbeitsleistung äussert sich dies durch Herabsetzung des Nutzeffektes.

Während nun einmal die Größe von V_{max} vom Verdrängungsmechanismus am CoA mit den Metaboliten aus endogener Glucose abhängig ist, zeigt sich zum anderen, daß das V_{max} der Fettsäure von der aufgebrachten Leistung abhängt. Bei Hexanoat beträgt es am stillgestellten Herzvorhof rund 50 % der Werte, die beiner Frequenz von etwa 100/min gewonnen wurden (GLOMME, 1968; SCHNEIDER, 1970). Auf Grund der Untersuchungen der Frequenzabhängigkeit waren wir in der Lage, unsere V_{max}-Werte auf eine Einheitsfrequenz von 100/min umzurechnen, so daß zum ersten Mal eine Vergleich der V_{max}-Werte ermöglicht wurde. Inwieweit feinere Schwankungen der K_m-Werte in Abhängigkeit von V_{max} und der verrichteten Arbeit vorliegen, ist aus unseren Versuchen nur sehr schwer zu sagen. Die Ergebnisse sind zum Teil nicht einheitlich, da auf Grund der Schwankungsbreite der Meßtechnik feinere Unterschiede nicht eindeutig erfaßbar sind.

Wir haben den Eindruck gewonnen, daß sich durch elektrische Stimulierung die K_m-Werte erhöhen können, so daß wir weiterhin den spontanschlagenden Herzvorhof für das geeignetere Testmodell halten, dies gilt vor allem bei Langzeitversuchen. Interessant ist, daß durch Erhöhung der Leistung mit Orciprenalin, die vor allem bei Oktanoat untersucht wurde, der V_{max}-Wert noch wesentlich gesteigert werden kann. Erhöhter Energieverbrauch führt damit zu einer Erhöhung des V_{max}, ohne daß sich dabei die Michaelis-Konstante verschiebt. Ähnlich wurde es auch von SIESS, KELLER et al. (1970) bei Hexanoat und Glucose und auch bei Glucose und Pyruvat beobachtet. In unseren Versuchen zeigte sich bei Zusatz von Glucose nach Einstellen des Decarboxylierungsgleichgewichtes mit ^{14}C-Oktanoat, daß eine Verschiebung zur Kohlenhydrat-Oxydation eintrat (Abb. 19). Steigert man die Leistung mit Orciprenalin, so wird diese Verschiebung noch deutlicher: Bei adrenerger Stimulierung wird also offensichtlich bei Anwesenheit exogener Glucose oder Glykogen über ein Anfluten von Pyruvat die Fettsäure verdrängt. Diese Beobachtungen stimmen mit den gemachten Beobachtungen am Menschen nach Leistungssteigerung überein (KEUL et al. 1965).

Die Versuche mit ^{14}C-Hexanoat und ^{14}C-Glucose bei absteigenden Temperaturen, zeigen besonders deutlich, daß gerade hinsichtlich des Nutzeffektes zwischen spontanschlagendem und elektrisch gereiztem Herzvorhof völlig verschiedene Bedingungen herrschen: Während die Spontan-Rhythmik S-förmig zwischen 37,5 und 17,5° C bis zum Nullpunkt abfällt, und durch elektrische Stimulierung eine Linksverschiebung dieser S-Kurve bis zu etwa 6° C eintritt, findet sich bei der Kontraktionsarbeit pro Schlag zwischen 37,5° und 17,5° C ein Anstieg der Kontraktionskraft, die auch bei rhythmischer Reizung (F = 100/min) sehr deutlich zu beobachten ist. Der Unterschied im Verlauf des Nutzeffektes, der bei elektrischer Reizung zwischen 37,5 und 25° C ansteigt, bem spontanschlagenden Herzvorhof dagegen abfällt, weist besonders eindringlich darauf hin, daß nach elektrischer Reizung offensichtlich andere Bedingungen herrschen als am spontanschlagenden Herzvorhof. Dies erscheint auch im Zusammenhang mit den Beobachtungen der veränderten Kinetik der Substrat-Oxydation gegenüber dem spontanschlagenden Herzvorhof bei elektrischer Reizung von Bedeutung zu sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG:

1. An isolierten, spontanschlagenden, elektrisch gereizten und stillgestellten Herzvorhöfen wurde in einem rezirkulierenden System kontinuierlich die Decarboxylierungsrate der Na-Salze ^{14}C-markierter, kurzkettiger Fettsäuren (Capronsäure = Hexanoat, Caprylsäure = Oktanoat und Caprinsäure = Dekanoat) und ^{14}C-Glucose gemessen.

2. Es besteht in bestimmten Konzentrationsbereichen eine Kinetik der Oxydation, welche es erlaubt, scheinbare Michaelis-Konstanten (K_m) und maximale Oxydationsraten (V_{max}) der exogenen Substrate zu bestimmen.

3. Die Oxydation der untersuchten Fettsäuren zeigt mit zunehmender Zahl der C-Atome von C_6 bis C_{10} eine Abnahme der K_m-Werte von 0,4 mM bis auf 0,16 mM. Die maximale Oxydationsrate sinkt dabei beträchtlich ab.

4. Aus der gefundenen Kinetik resultieren Verdrängungs-Mechanismen der untersuchten Fettsäuren untereinander und mit Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels. Alle untersuchten Fettsäuren hemmen die Oxydation exogener Glucose bis zu 60 %. Hexanoat hemmt die Oxydation von ^{14}C-Oktanoat, während Oktanoat die Oxydation von ^{14}C-Hexanoat steigert.

5. An stillgestellten Herzvorhöfen werden Fettsäuren bevorzugt verbrannt; bei Leistungssteigerung aber Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels.

6. An stillgestellten Herzvorhöfen führen höhere Konzentrationen von Oktanoat und bereits niedrige Konzentrationen von Dekanoat zu einem Anstieg der Glucose-Oxydation. Dekanoat steigert dabei den Sauerstoffverbrauch beträchtlich. Die Ursachen hierfür werden diskutiert.

7. Die Fettsäuren zeigen im Konzentrationsbereich bis zu 1,6 mM, bzw. 3,2 mM eine zunehmende Beeinträchtigung der Funktion durch negativ inotrope Wirkung und beginnende Kontraktur und später stärkere Frequenzsteigerung mit Rückstandskontraktur. Auch am stillgestellten Herzvorhof tritt nach 1,6 mM Dekanoat eine Kontraktur auf, wobei der gesteigerte Sauerstoffverbrauch wieder abnimmt.

8. An spontanschlagenden Herzvorhöfen werden die maximalen Oxydationswerte sehr stark von der Leistung bestimmt, während die K_m-Werte davon kaum beeinflußt werden. Nach elektrischer Stimulierung steigen die K_m-Werte an, während die V_{max}-Werte der jeweiligen Leistung spontanschlagender Herzvorhöfe entsprechen.

9. In einem Temperaturbereich zwischen 37,5 und 0° C wurden jeweils Leistung und Oxydationsrate von Glucose bzw. Hexanoat bestimmt. Dabei zeigt sich bei elektrischer Stimulierung eine Zunahme des Nutzeffektes bis zu 25° C, während am spontanschlagenden Herzvorhof der Nutzeffekt sinkt. Bei 0° C beträgt die Fettsäure-Oxydation noch etwa 2 %, bei Glucose-Oxydation aber 6 % des Ausgangswertes spontanschlagender Herzvorhöfe bei 37,5° C.

I. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T :

Bartos, J. — Leistung und Oxydation ^{14}C-markierter Sub - strate des Eiweiß-, Fett- und Kohlenhydrat - stoffwechsel in spontanschlagenden, isolier - ten.Meerschweinchenherzvorhöfen unter Ein - wirkung von Pharmaka. Med. Inaug. Dissert. Marburg (1970)

Bing, R. J. / Siegel, A. / Ungar, I. / Gilbert, M. — Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. Am. J. Med. 16, 504 (1954)

Bischoff, M. — Die Ökonomie der Herzmuskelleistung bei Glucose- und Fettsäureoxydation und ihre Beeinflussung durch Pharmaka. Med. Inaug. Dissert. Marburg (1970)

Dixon — nach Webb, L. J.: Enzyme and Metabolic Inhibitors. Academic Press, New York Vol. 1 pp. 145 - 162 (1963)

Geigy, J. R. — Documenta Geigy Wissenschaftliche Tabellen 6. Auflage (Basel) (1960)

Glomme, H. — Untersuchungen über die Regulationen der Energiebildung aus dem Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel im isolierten Meerschwein - chenherzvorhof und ihre Beeinflussung durch Pharmaka. Med. Inaug. Dissert. Marburg (1968)

Hischebeth, H-G. — Das Überleben von isolierten, spontanschla - genden Meerschweinchenherzvorhöfen bei Hypo - thermie in iso- und hyperbaren Gasgemischen. Med. Inaug. Dissert. Marburg (1972)

Hochrein, H.
Heck, P.
Zur Frage des Glucose- und Lactatverbrauchs bei verschiedenen Belastungszuständen des Herzens und in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.
Arch. f. Kreislauff. 52, 175 (1967)

Itzel, W.
Die Beteiligung des Glykogens am Energieumsatz isolierter, spontanschlagender Herzvorhöfe in Abhängigkeit von exogenen Substraten und nach Einwirkung von Adrenalin.
Med. Inaug. Dissert. Marburg (1969)

Keller, Hj.
Die gleichzeitige und kontinuierliche Messung von Kontraktionsleistung, Frequenz, Decarboxylierungsrate ^{14}C-markierter Substrate und Sauerstoffverbrauch isolierter, spontanschlagender Meerschweinchenherzvorhöfe als Methode zur Prüfung herzwirksamer Pharmaka.
Med. Inaug. Dissert. Marburg (1970)

Keul, J.
Doll, E.
Steim, H.
Homburger, H.
Kern, H.
Reindell, H.
Über den Stoffwechsel des menschlichen Herzens. Die Substratversorgung des gesunden menschlichen Herzens in Ruhe, während und nach körperlicher Arbeit.
Pflüg. Arch. d. Ges. Physiol. 282, 1 (1965)

Klingenberg, M.
Bode, Ch.
Die Veratmung von Fettsäuren in isolierten Mitochondrien.
Biochem. Zeitschr. 341, 271 (1965)

Lineweaver, H.
Burk, D.
The Determination of Enzyme Dissociation Constants.
J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934)

Mensing, H. J.
Med. Inaug. Dissert. Marburg (1972)
In Vorbereitung

Müller, K. Eine Untersuchungsmethode zur gleichzeitigen Bestimmung der Leistung und des Substrat - verbrauches isolierter Meerschweinchenherz - höfe unter pharmakologischen Einwirkungen. Med. Inaug. Dissert. Marburg (1965)

Peter, U. Leistung und Glucosedecarboxylierung iso - lierter Meerschweinchenherzvorhöfe nach Ein - wirkung von Pharmaka unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen. Med. Inaug. Dissert. Marburg (1967)

Range, H. Untersuchungen über die Ökonomie der Herz - muskelleistung unter Sympathomimetika, ß-Rezeptorenblockern und g-Strophanthin. Med. Inaug. Dissert. Marburg (1970)

Röger, U. Histologische, autoradiographische und bio - chemische Untersuchungen zur Frage der Energieversorgung und des Einbaus von ^{14}C-markierten Substraten in isolierte, spontan - schlagende Herzvorhöfe von Meerschweinchen. Med. Inaug. Dissert. Marburg (1970)

Schneider, P. Aufnahmekinetik, Konkurrenz und Nutzeffekt ^{14}C-markierter Substrate des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels im Herzmuskel vor und nach Einwirkung von Adrenalin. Med. Inaug. Dissert. Marburg (1970)

Siess, M. Direct and Indirect Pharmacological Effects on the Decarboxilation Rate of ^{14}C-Glucose and ^{14}C-Fatty Acids in Isolated Atria of Guinea Pigs.
in Glason-Waser:
"The Use of Radioactive Isotopes in Pharma - cology". p. 357 - 374
J. Wiley and Sons, Lt. Chichester, England (1969)

Siess, M.
Kinetics of Decarboxilation Rate, Mutual Competition and Efficiency of ^{14}C-Carbo - hydrates and ^{14}C-Fatty Acids in the Intact Heart Muscle Cell.
Abstracts of the 6. FEBS-Meeting
Madrid (1969), Nr. 365, p. 126

Siess, M.
Glomme, H.-E.
Die Decarboxylierungsgeschwindigkeit von ^{14}C-Glucose und ^{14}C-Hexanoat im isolierten Meerschwinchenherzvorhof in Abhängigkeit von der extrazellulären Substratkonzentration, ihrer Konkurrenz sowie der direkten Einwirkung von Pharmaka.
Arzneimittelf. 18, 1357 (1968)

Siess, M.
Keller. H. J.
Schare, E.
Geissler, J.
Müller, G.
The Continuous and Simultaneous Measurement of O_2-Consumption, Rate of Decarboxilation of ^{14}C-Substrates and the Performance of Spontaneously-Beating Isolated Heart Atria of Guinea Pigs.
J. of Mol. and Cell. Card. 1, 261 (1970)

Webb. L. J.
Enzyme and Metabolic Inhibitors.
Academic Press, New York (1963)
Vol. 1, pp. 145 - 162

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. med. M. Siess ganz herzlich danken für die Überlassung des Themas und die freundliche und großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. Ing. Müller vom Zentralen Entwicklungslabor für Elektronik der Universität Marburg danke ich für die Wartung der elektronischen Geräte.

Herrn Glasbläsermeister Jung, Herrn Feinmechanikermeister Otto und Herrn Braun von den Werkstätten der Institutsgruppe Lahnberge der Universität Marburg danke ich für die Durchführung der Reparaturen und der Herstellung neuer Teile.

Fräulein Bamberger und Herrn Rau sage ich Dank für die technische Ausarbeitung der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 6. Mai 1945 wurde ich als Sohn des Studienrats Ernst Ostheim und seiner Frau Elisabeth, geborene Baumann, in Gettenau, Kreis Büdingen, geboren.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die gemeinsame Musterschule in Friedberg, anschließend die Augustinerschule in Friedberg, ein Gymnasium für alte und neue Sprachen, und entschied mich hier später für den naturwissenschaftlichen Zweig, in dem ich am 15. Februar 1965 das Abitur bestand.

Ab Sommersemester 1965 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg das Studium der Zahnheilkunde; ich bestand am 25. März 1966 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 23. März 1968 die zahnärztliche Vorprüfung und das Examen bestand ich am 26. 11. 1970.

Vom 1. Januar 1971 bis zum 30. März 1972 befaßte ich mich mit dem experimentellen Teil dieser Arbeit.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Bommer, Dimroth, Gedigk, Haan, Havemann, Hennis, Hering, Heuser, Janke, Kamke, Karlson, Korb, Kreutz, Mann, Niemayer, Pantke, Petry, Pfütz, Riecken, Rodeck, Rohen, Rosemann, Salfeld, Schiff, Schmid, Schmidt, Seidel, Siegert, Siess, Walcher, Wendt, Witzel.